



**Ana Maria Rodrigues Alves**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

## **Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de $\text{Fe}_3\text{O}_4$**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira, DCM-FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor João Paulo Borges, DCM-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário António Basto Forjaz Secca,  
Professor Associado da Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Doutora Joana Dória Vaz Pinto, Doutorada em Física  
pela Faculdade de ciências e tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa

Vogais: Doutora Isabel Maria das Mercês Ferreira, Professora  
Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa

Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges, Professor  
Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro, 2012**

**Ana Maria Rodrigues Alves**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para  
tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das  
soluções coloidais de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Isabel Maria Mercês Ferreira, DCM-FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor João Paulo Borges, DCM-FCT/UNL

**Outubro, 2012**

Copyright © - Todos os direitos reservados. Ana Maria Rodrigues Alves; Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores, professora Isabel Ferreira e professor João Paulo Borges, por me terem aceitado como aluna a orientar, pelas sugestões apresentadas ao longo do trabalho, pela disponibilidade em discutir os resultados obtidos e pela partilha de conhecimentos que me prestaram durante a realização deste trabalho.

À Paula Soares, por toda a disponibilidade demonstrada, desde o início, para me ajudar ao longo deste trabalho, e por toda a colaboração prestada no decurso do mesmo. Foi uma ajuda muitíssimo importante durante estes meses e fundamental para que os objetivos inicialmente propostos fossem alcançados. Foi uma pessoa amiga, paciente e incansável, que esteve sempre presente nos momentos de maior angústia e nervosismo inerentes à realização deste trabalho. Por toda a ajuda prestada, por toda a paciência, por todo o apoio e compreensão, Paula, um Muito Obrigada!

Ao CENIMAT pela cedência das instalações e equipamentos, bem como a ajuda dos seus funcionários, na visualização de algumas imagens no SEM e caracterização das NPs em DRX.

Ao Instituto Superior Técnico, pela disponibilização das instalações e equipamentos, em particular para a visualização de imagens no TEM.

Ao Nuno, o meu companheiro de vida, pela forma como me incute a alegria de viver, como me estimula a crescer e como me encoraja sempre a fazer tudo o melhor possível. Acima de tudo, pelo inestimável apoio e confiança, que preenchem as falhas que vou tendo ao longo deste percurso, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio, incentivo e pelos diversos sacrifícios suportados ao longo destes anos para que fosse possível realizar esta etapa.

Gostaria também de agradecer a todos os colegas de laboratório, pelo bom ambiente de trabalho, e a todos aqueles que me foram ajudando ao longo deste trabalho.



## **Resumo**

A nanotecnologia é uma área em crescente desenvolvimento nos dias de hoje e cuja importância é óbvia para diversas áreas científicas como a física, a química e a biologia. A capacidade de manipular átomos e moléculas e a sua interação com as moléculas biológicas torna a nanotecnologia numa área de grande interesse na medicina.

As nanopartículas são, por definição, partículas cujas 3 dimensões se encontram à escala nano (nano-escala). Dentro destas, as nanopartículas magnéticas (mNPs) constituem uma importante classe devido às suas propriedades únicas.

As nanopartículas magnéticas são geralmente constituídas por um elemento metálico e podem ser manipuladas utilizando um campo magnético externo. Estas propriedades tornam-nas extremamente vantajosas para a sua aplicação em medicina, tanto no diagnóstico como na terapêutica.

O presente trabalho visou o *Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>*. De forma particular, o objetivo principal deste projeto foi a produção de nanopartículas de óxido de ferro, em particular de magnetite, através do método da precipitação química, focando-se no estudo da estabilidade de várias soluções de mNPs, utilizando três tipos de surfactantes (ácido oleico, citrato de sódio e triton X-100), em diversas concentrações.

A fim de verificar qual a concentração que torna a solução de mNPs estável por um período de tempo superior, realizou-se um estudo sobre a variação do espectro de absorvância, recorrendo à técnica de espectroscopia UV-VIS.

Estas mNPs foram caracterizadas em termos composicionais e estruturais recorrendo a outras técnicas: SEM, TEM, FTIR, DLS e DRX. Avaliou-se ainda a sua estabilidade em solução por um período de 2 meses.

No final deste projeto concluiu-se que a espectroscopia UV-VIS é um método prático, simples e rápido de avaliar a estabilidade das mNPs e que dos surfactantes utilizados, o citrato de sódio é aquele que mantém as NPs mais tempo em suspensão.

**Palavras-chave:** nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, magnetite, precipitação química, surfactantes, espectroscopia UV-VIS, estabilidade de suspensões.



## **Abstract**

Nanotechnology is currently a developing area and its importance is obvious to many scientific fields such as physics, chemistry and biology. The ability to manipulate atoms and molecules and their interaction with biological molecules makes nanotechnology an area of interest in medicine.

By definition, nanoparticles are particles whose three dimensions are at the nanoscale. Within these, the magnetic nanoparticles (mNPs) are an important class because of their unique properties.

Magnetic nanoparticles are composed of a metallic nucleus and can be manipulated using an external magnetic field. These properties render them great advantages for application in medicine, both in diagnosis and therapy.

The aim of this work was the development of magnetic nanoparticles envisaging cancer treatment: studying of the synthesis and stabilization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> colloidal solutions. In particular, the main objective of this project was the production of iron oxide nanoparticles, especially magnetite, through the method of chemical precipitation, focusing on stability studies of various mNPs solutions, using three types of surfactants (oleic acid, sodium citrate and triton X-100) at different concentrations.

In order to determine the concentration in which the mNPs are stable as a colloid for a long time, it was carried out a study about the changes of transmission spectra in the wavelength range corresponding to the absorption of mNPs using the UV-VIS spectroscopy technique.

The structure and composition of these mNPs were characterized using other techniques: SEM, TEM, FTIR, DLS and XRD. The stability test for a long period was also performed.

From the obtained results it was concluded that the UV-VIS is a practical, simple and quick method to evaluate the stability of mNPs and evaluate the effect of different surfactants. Thus of the three surfactants used, sodium citrate is one that maintains the NPs in suspension longer.

**Keywords:** magnetic nanoparticles of iron oxide, magnetite, chemical precipitation, surfactants, UV-VIS, stability of suspensions





# Índice

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>COMPOSTOS QUÍMICOS.....</b>	<b>XV</b>
<b>SÍMBOLOS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1.    NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	1
1.2.    MAGNETITE.....	5
1.3.    APLICAÇÕES DAS MNPS NO TRATAMENTO DE CANCRO.....	5
1.3.1.    Libertação de fármacos.....	6
1.3.2.    Ressonância Magnética de Imagem .....	7
1.3.3.    Hipertermia .....	8
<b>2. MÉTODOS DE SÍNTESE DE MNPS .....</b>	<b>11</b>
2.1.    PRECIPITAÇÃO QUÍMICA .....	11
2.2.    MICROEMULSÃO .....	13
2.3.    SÍNTESE HIDROTÉRMICA .....	19
2.4.    DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA .....	20
2.5.    CARACTERIZAÇÃO DAS MNPS.....	21
<b>3. REVESTIMENTO DAS MNPS.....</b>	<b>25</b>
3.1.    ÁCIDO OLEICO.....	26
3.2.    CITRATO DE SÓDIO.....	27
3.3.    TRITON X-100.....	27
3.4.    QUITOSANO .....	28
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>31</b>
4.1.    SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	31
4.1.1.    Materiais.....	31
4.1.2.    Procedimento.....	31
4.2.    INFLUÊNCIA DE SURFACTANTES .....	32

---

4.2.1.	<i>Materiais</i> .....	32
4.2.2.	<i>Procedimento</i> .....	32
4.3.	FUNCIONALIZAÇÃO COM QUITOSANO .....	32
4.3.1.	<i>Materiais</i> .....	33
4.3.2.	<i>Procedimento</i> .....	33
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs.....	34
4.4.1.	<i>Absorção UV-VIS</i> .....	34
4.4.2.	<i>Análise da morfologia por SEM</i> .....	35
4.4.3.	<i>Diâmetro hidrodinâmico das mNPs (DLS)</i> .....	35
4.4.4.	<i>Difração de raios-X (DRX)</i> .....	35
4.4.5.	<i>Técnica de FTIR</i> .....	35
4.4.6.	<i>Análise da morfologia por TEM</i> .....	36
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1.	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	37
5.2.	INFLUÊNCIA DOS SURFACTANTES .....	42
5.2.1.	<i>Ácido oleico</i> .....	42
5.2.2.	<i>Citrato de sódio</i> .....	43
5.3.	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS SURFACTANTES.....	44
5.3.1.	<i>Ácido oleico</i> .....	45
5.3.2.	<i>Citrato de sódio</i> .....	51
5.3.3.	<i>Triton X-100</i> .....	56
5.4.	FUNCIONALIZAÇÃO COM QUITOSANO .....	60
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>65</b>

## Índice de figuras

FIGURA 1.1 – APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (RETIRADO DE <sup>[6]</sup> ).	2
FIGURA 1.2 – ESQUEMA DA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA UTILIZANDO MNPs QUE PODEM DIAGNOSTICAR (IRM) E TRATAR CANCRO (HIPERTERMIA) SIMULTANEAMENTE (RETIRADO DE <sup>[31]</sup> ).	4
FIGURA 1.3 – ESTRUTURA DA MAGNETITE (OBTIDA DE <sup>[33]</sup> ).	5
FIGURA 1.4 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UM SISTEMA DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DE MNPs UTILIZANDO UM CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO PARA DIRECIONAR AS MNPs PARA O LOCAL DO TUMOR (OBTIDA DE <sup>[37]</sup> ).	7
FIGURA 2.1 – TIPOS DE MICROEMULSÕES ESQUEMATIZADAS PELA FASE OLEOSA (CINZA), FASE AQUOSA (BRANCA) E FILME INTERFACIAL DE SURFACTANTE; A) MICROEMULSÃO O/A; B) MICROEMULSÃO A/O (RETIRADO DE <sup>[49]</sup> ).	15
FIGURA 2.2- ESQUEMA ILUSTRATIVO DA COPRECIPITAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> VIA MICROEMULSÃO A/O (ADAPTADO DE <sup>[8]</sup> ).	16
FIGURA 2.3- ESTRATÉGIA DE PREPARAÇÃO DE SPIONS MONODISPERSAS DENTRO DE GOTAS DE MICROEMULSÃO A/O. OS SAIS DE FERRO SÃO DISSOLVIDOS DENTRO DOS NÚCLEOS AQUOSOS DAS MICELAS E PRECIPITAM ATRAVÉS DA SOLUÇÃO ALCALINA, PARA OBTENIR PARTÍCULAS COM O TAMANHO DESEJADO (ADAPTADO DE <sup>[2]</sup> ).	18
FIGURA 3.1 – ESTRUTURA DO ÁCIDO OLEICO (OBTIDA DE <sup>[80]</sup> ).	27
FIGURA 3.2 – ESTRUTURA DO CITRATO DE SÓDIO (OBTIDA DE <sup>[83]</sup> ).	27
FIGURA 3.3 – ESTRUTURA DO TRITON X-100 (OBTIDA DE <sup>[84]</sup> ).	28
FIGURA 3.4- ESTRUTURA DO QUITOSANO (OBTIDA DE <sup>[90]</sup> ).	29
FIGURA 4.1 – TÉCNICA DE MONTAGEM DA GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA.	34
FIGURA 5.1 – NPs DE MAGNETITE APÓS A SUA SÍNTESE (A)), APÓS 15 MINUTOS DA SUA SÍNTESE (B)) E APÓS SECAS (C)).	37
FIGURA 5.2 – ESPECTRO DAS NPs DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> AO LONGO DO TEMPO.	38
FIGURA 5.3 - IMAGEM DE SEM DAS MNPs DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> E A RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETROS OBTIDA POR DLS.	39
FIGURA 5.4 – DIFRATOGRAMA DE DRX DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	39
FIGURA 5.5 DIFRATOGRAMA DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> COM TRITON X-100.	41
FIGURA 5.6 – ESPECTRO DE FTIR DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	41
FIGURA 5.7- IMAGEM DAS MNPs OBTIDA NO SEM, COM ÁCIDO OLEICO E 5 MINUTOS DE AGITAÇÃO.	42
FIGURA 5.8 – IMAGEM DAS MNPs OBTIDA NO SEM, COM CITRATO DE SÓDIO E 5 MINUTOS DE AGITAÇÃO.	43
FIGURA 5.9 – IMAGEM DE TEM E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MNPs COM CITRATO DE SÓDIO (0,00125M).	44
FIGURA 5.10 - IMAGEM DE TEM E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MNPs COM TRITON X-100 (0,026M).	45

FIGURA 5.11 - MEDIÇÕES EFETUADAS IMEDIATAMENTE E 24H APÓS A SÍNTESE DE MNPs COM ÁCIDO OLEICO EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES: A) 0,008M; B) 0,016M; C) 0,032M; D) 0,064M; E) 0,128M; F) 0,192M.....	46
FIGURA 5.12 – COMPARAÇÃO DO VALOR DA ABSORVÂNCIA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO OLEICO, NO PICO DE MAIOR INTENSIDADE (224 NM). ....	48
FIGURA 5.13 – COMPORTAMENTO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO OLEICO C=0,064M AO LONGO DO TEMPO, NO PICO DE MAIOR INTENSIDADE.....	49
FIGURA 5.14 - PERCENTAGEM DE MASSA EM SUSPENSÃO, AO LONGO DO TEMPO, DAS MNPs DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO OLEICO (PONTOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO, COM N=3). ....	50
FIGURA 5.15 - MEDIÇÕES EFETUADAS IMEDIATAMENTE E 24H APÓS A SÍNTESE DE MNPs COM CITRATO DE SÓDIO EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES: A) 0,00125M; B) 0,0025M; C) 0,005M; D) 0,01M; E) 0,02M; F) 0,03M. ....	52
FIGURA 5.16 – COMPARAÇÃO DO VALOR DA ABSORVÂNCIA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CITRATO DE SÓDIO NO PICO DE MAIOR INTENSIDADE (300 NM). ....	53
FIGURA 5.17 – COMPORTAMENTO DA SOLUÇÃO DE CITRATO DE SÓDIO C=0,005M AO LONGO DO TEMPO, NO PICO DE MAIOR INTENSIDADE.....	54
FIGURA 5.18 - PERCENTAGEM DE MASSA EM SUSPENSÃO, AO LONGO DO TEMPO, DAS MNPs DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> COM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE CITRATO DE SÓDIO (PONTOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO, COM N=3). ....	55
FIGURA 5.19 - MEDIÇÕES EFETUADAS IMEDIATAMENTE E 24H APÓS A SÍNTESE DE MNPs COM TRITON X-100 EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES: A) 0,017M, B) 0,026M, C) 0,034M, D) 0,043M, E) 0,052M, F) 0,061M. ....	56
FIGURA 5.20 - COMPARAÇÃO DO VALOR DA ABSORVÂNCIA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRITON X-100, NOS PICOS DE MAIOR INTENSIDADE (222 NM E 276 NM). ....	57
FIGURA 5.21 - COMPORTAMENTO DA SOLUÇÃO DE TRITON X-100 C=0,061M AO LONGO DO TEMPO, NOS PICOS DE MAIOR INTENSIDADE.....	58
FIGURA 5.22 - PERCENTAGEM DE MASSA EM SUSPENSÃO, AO LONGO DO TEMPO, DAS MNPs DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> COM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE TRITON X-100 (PONTOS CORRESPONDEM A UM VALOR MÉDIO, COM N=3). ....	59
FIGURA 5.23 - IMAGEM DE TEM E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MNPs COM QUITOSANO (O QUITOSANO ESTÁ ASSINALADO COM AS SETAS VERMELHAS).....	60

## **Índice de tabelas**

TABELA 1.1 – SPIONS COMERCIALIZADAS ATUALMENTE (ADAPTADO DE <sup>[3]</sup> ).....	3
TABELA 2.1 – COMPARAÇÃO ENTRE MICROEMULSÕES E EMULSÕES (ADAPTADO DE <sup>[49]</sup> ). ....	14
TABELA 2.2 – RESUMO DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NPs COM INDICAÇÃO DA INFORMAÇÃO FORNECIDA. ‘X’ INDICA QUE A TÉCNICA FORNECE INFORMAÇÕES INCERTAS OU INCOMPLETAS PARA UMA VASTA GAMA DE MATERIAIS; ‘XX’ INDICA QUE A TÉCNICA FORNECE INFORMAÇÃO INTERMÉDIA; ‘XXX’ INDICA QUE A TÉCNICA É AMPLAMENTE (MAS NÃO UNIVERSAL) APLICÁVEL E MUITAS VEZES DÁ INFORMAÇÕES BASTANTE FIÁVEIS (ADAPTADO DE <sup>[35]</sup> ).....	22
TABELA 5.1 - VALOR MÉDIO DE CADA PONTO E RESPETIVO DESVIO-PADRÃO (EM %). ....	50
TABELA 5.2 - VALOR MÉDIO DE CADA PONTO E RESPETIVO DESVIO-PADRÃO (EM %). ....	55
TABELA 5.3 – VALOR MÉDIO DE CADA PONTO E RESPETIVO DESVIO-PADRÃO (EM %). ....	59



## **Lista de abreviaturas**

A/O – água em óleo  
AOT – dioctilsulfocionato de sódio  
CS – quitosano  
CTAB – brometo de cetiltrimetilamonio  
DLS – dispersão dinâmica de luz  
DRX – difração de raios-X  
EDS – espectroscopia por dispersão em energia  
FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier  
IRM – Imagem de ressonância magnética  
mNP(s) – nanopartícula(s) magnética(s)  
NP(s) – nanopartícula(s)  
O/A – óleo em água  
PEG – polietileno glicol  
PEO – óxido de polietileno  
PVA – álcool polivinílico  
RES – sistema reticuloendotelial  
RPM – rotações por minuto  
SDS – dodecilsulfato de sódio  
SEM – microscopia eletrónica de varrimento  
SPION(s) – nanopartícula(s) superparamagnética(s) de óxido de ferro  
TEM – microscopia eletrónica de transmissão  
TPP – tripolifosfato de sódio

## **Compostos químicos**

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – magnetite  
Fe(acac)<sub>3</sub> – acetilacetato de ferro III  
Fe(Co)<sub>5</sub> – pentacarbonil de ferro  
FeO(OH) - goetite  
γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – magmite  
NaOH – hidróxido de sódio  
KBr – brometo de potássio



## **Símbolos**

K – constante de forma

$\lambda$  – comprimento de onda da radiação

$\beta$  – largura a meia altura do pico

$\theta$  – ângulo de difração

## 1. Introdução

Neste capítulo faz-se uma abordagem às nanopartículas magnéticas de óxido de ferro explicando em que consistem, quais as suas principais características e propriedades magnéticas, e quais as suas principais aplicações, focando este último ponto no tratamento do cancro. Dá-se uma noção das características e vantagens deste tipo de nanopartículas no tratamento do cancro.

### 1.1. Nanopartículas magnéticas

A nanotecnologia tem evoluído para um campo multidisciplinar, revolucionando as ciências básicas (física aplicada, química, mecânica, engenharia biológica e elétrica, robótica e medicina) e as suas respetivas aplicações <sup>[1]</sup>. As partículas à nano-escala têm vindo a atrair cada vez mais atenções e têm sido utilizadas nos campos da biociência e da medicina desde os anos 70 <sup>[2]</sup>.

A dimensão das nanopartículas torna-as candidatas ideais para a nanoengenharia de superfícies e produção de nanoestruturas funcionais <sup>[3]</sup>. Devido às suas características únicas, não presentes em outros materiais, as NPs podem ser utilizadas quase exclusivamente em algumas técnicas médicas <sup>[2]</sup>.

De entre os diferentes tipos de NPs, as mNPs são uma classe importante, devido às suas características únicas <sup>[4]</sup>. As propriedades magnéticas das NPs surgem devido a uma combinação da sua composição atómica, da sua estrutura cristalina e do efeito do seu tamanho <sup>[1]</sup>. As mNPs são compostas por elementos magnéticos, como ferro, níquel, cobalto e seus óxidos, entre outros. Podem ser manipuladas através de um campo magnético externo, o que apresenta uma grande vantagem, uma vez que evita técnicas de diagnóstico e terapêutica invasivas <sup>[4]</sup>.

As NPs de óxido de ferro são superiores quando comparadas com NPs de outro metal, devido à sua biocompatibilidade e estabilidade <sup>[4]</sup>, além da biodegradabilidade, o que tem contribuído para a sua vasta utilização em aplicações biomédicas <sup>[5]</sup>.

Uma propriedade interessante das NPs de óxido de ferro é a sua capacidade para gerar calor quando submetidas a um campo magnético alternado. Este fenómeno térmico pode ser devido à perda de energia durante o processo de desmagnetização. Esta propriedade é crucial para as aplicações na hipertermia <sup>[6]</sup>, nas quais é necessária a aplicação de calor numa determinada zona do organismo.

Devido a estas propriedades, as nanopartículas de óxido de ferro (também conhecidas como SPIONs ou nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro) são as mais utilizadas em aplicações biomédicas <sup>[7]</sup>. As SPIONs consistem em núcleos de óxido de ferro, que, quando injetadas no organismo, podem atingir uma determinada “zona-alvo” através da aplicação de campos magnéticos externos. Apresentam propriedades interessantes como por exemplo, além do

superparamagnetismo, elevado campo de saturação. Estas propriedades são responsáveis pela ausência da interação magnética quando o campo magnético é retirado. Tipicamente, as SPIONs apresentam duas configurações estruturais: i) um núcleo usualmente de magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou magmíte ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), revestido por um polímero biocompatível; ii) um polímero biocompatível poroso, no qual as SPIONs precipitam dentro dos poros <sup>[3]</sup>.

Existe um enorme potencial para utilizar as SPIONs em aplicações biomédicas para a libertação controlada de fármacos, hipertermia, diagnóstico por ressonância magnética de imagem, terapia génica e medicina regenerativa <sup>[8]</sup> (figura 1.1), em particular as NPs de magnetite <sup>[6]</sup>.

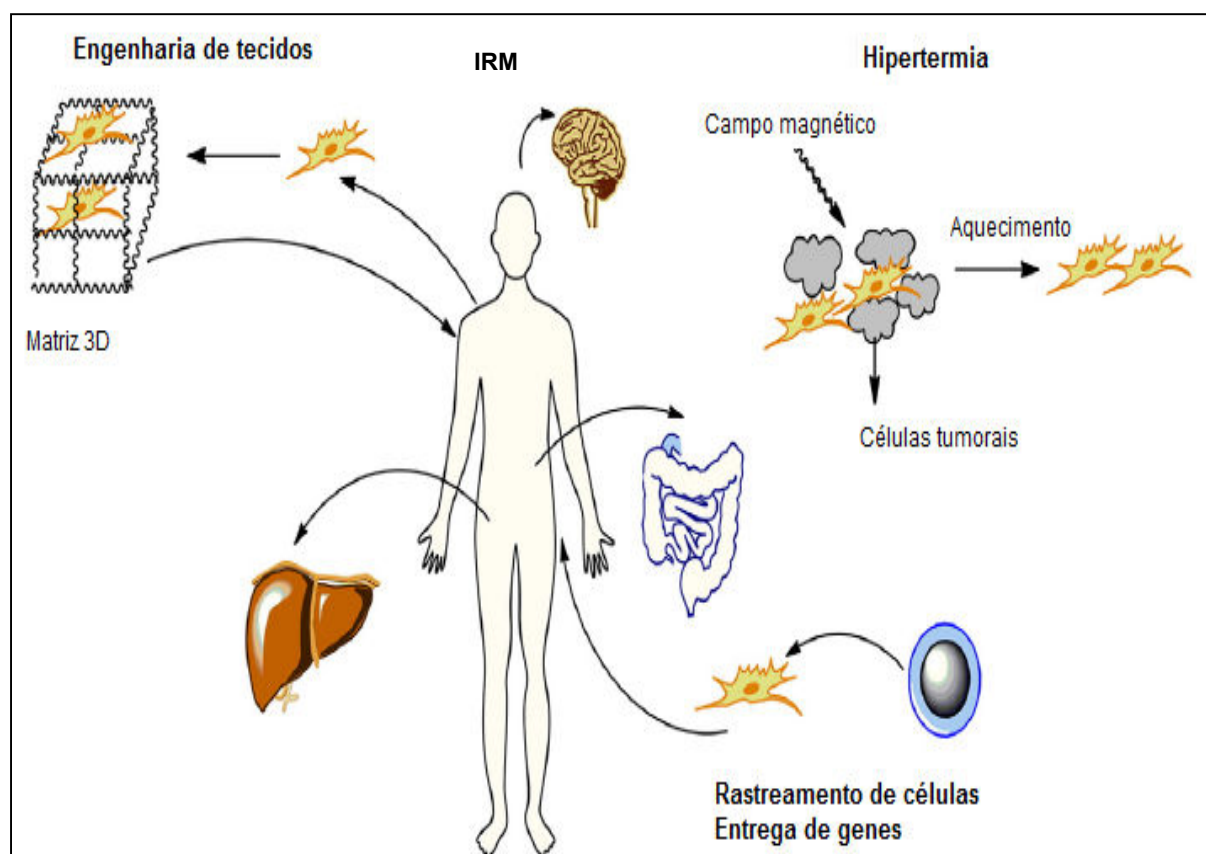


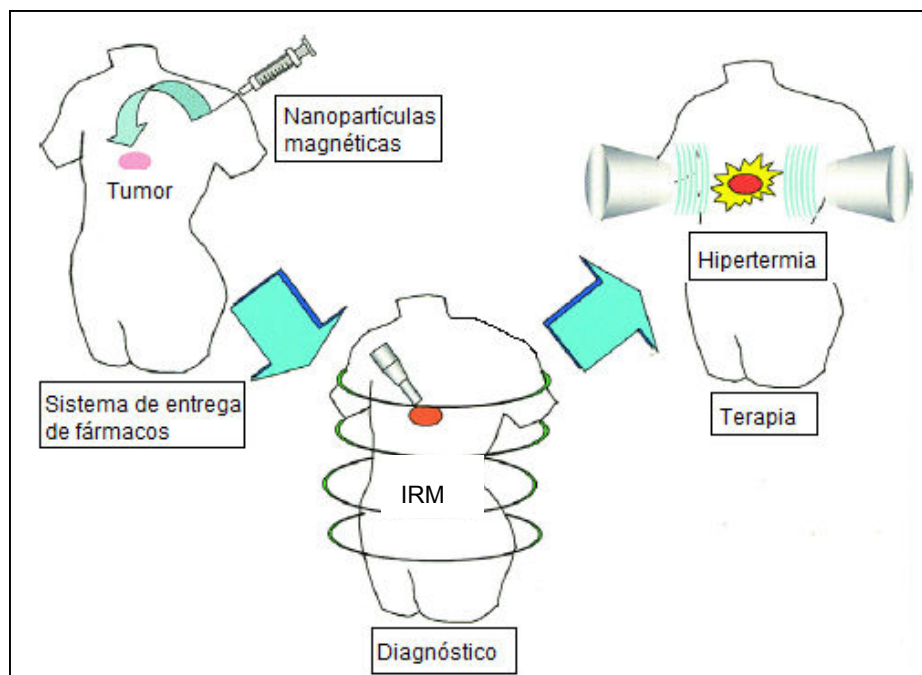
Figura 1.1 – Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas (retirado de <sup>[6]</sup>).

A tabela seguinte ilustra algumas SPIONs atualmente comercializadas, que são utilizadas em diferentes técnicas de diagnóstico e terapêutica.

**Tabela 1.1 – SPIONs comercializadas atualmente (adaptado de [3]).**

<b>Companhia</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referência</b>
<i>Stemcell Technologies</i>	Separação automatizada de células imunogénicas	[9]
<i>Micromod</i>	Entrega de fármacos, separação biomagnética, purificação de ácidos nucleicos	[10]
<i>Chemicell</i>	Sistemas de bioseparação e deteção	[11]
<i>Magnisense</i>	Bioensaios para diagnóstico humano animal, segurança alimentar e proteção animal	[12]
<i>Diagnostics Biosensors</i>	Biosensores de diagnóstico	[13]
<i>Dexter Magnetic Technologies</i>	Separação biomagnética	[14]
<i>Ocean Nanotech</i>	Síntese e produção de mNPs	[15]
<i>Imego</i>	Diagnóstico médico	[16]
<i>Integrated Engineering Software</i>	Software de análise eletromagnético, eletromecânico e eletrotérmico	[17]
<i>EMD chemicals</i>	Desenvolvimento de imunoensaios e imunoreagentes	[18]
<i>Magsense</i>	Bioseparação, diagnóstico, imunoensaio e medições bioanalíticas	[19]
<i>TurboBeads</i>	Separação magnética eficiente	[20]
<i>European Institute of Science</i>	Hipertermia	[21]
<i>Magnabeat Inc.</i>	Separação de diversas e diferentes bio-substâncias	[22]
<i>nanoTherics Ltd.</i>	Transfecção génica magnética	[23]
<i>SEPMAG Technologies</i>	Grandes volumes de sistemas de separação magnéticos	[24]
<i>Magforce</i>	Hipertermia	[25]
<i>AMAG Pharmaceuticals (Advanced Magnetics)</i>	Agentes de contraste de IRM, diagnóstico de doença cardiovascular e cancro	[26]
<i>Estapor</i>	Aplicação de microesferas magnéticas em imunoensaios	[27]
<i>Miltenyl Biotec</i>	Desenvolvimento de reagentes e instrumentos para uso em imunologia, biologia celular e molecular, bioinformática e tecnologia de células estaminais	[28]
<i>Invitrogen and Dynal Biotech</i>	Diagnóstico <i>in vitro</i> , purificação e separação de proteínas e células	[29]

Dentro das diversas aplicações biomédicas, as mNPs são utilizadas como agentes de contraste para a Imagem de Ressonância Magnética (IRM), vetores na distribuição controlada de fármacos ou agentes para a terapia por hipertermia [6]. As mNPs podem, assim, ser utilizadas para a terapia de cancro e, simultaneamente, como diagnóstico (figura 1.2). As mNPs têm preferência para se acumular no tecido tumoral tanto pelas suas dimensões reduzidas como pela possibilidade de serem funcionalizadas com marcadores celulares específicos. Estas partículas podem ser usadas como ferramenta no diagnóstico de cancro, pela IRM e terapia de cancro, pela hipertermia. Esta capacidade de diagnosticar e tratar doenças em simultâneo é um conceito emergente e é denominada teragnóstico (terapia + diagnóstico) [30].



**Figura 1.2 – Esquema da estratégia terapêutica utilizando mNPs que podem diagnosticar (IRM) e tratar cancro (hipertermia) simultaneamente (retirado de [31]).**

A biodistribuição das mNPs, *in vivo*, é fortemente afetada pelas propriedades da superfície de revestimento e sob influência de um campo magnético externo [6].

Após a sua introdução no organismo, as SPIONs devem ser capazes de escapar ao RES (sistema reticuloendotelial), apresentar baixa adsorção proteica [32], serem estáveis em água a pH neutro e salinidade fisiológica. Esta estabilidade coloidal depende das dimensões das partículas, que devem ser suficientemente pequenas para que a precipitação, devida à força gravitacional, seja evitada. Outro fator importante é a carga e a superfície química das partículas, o que conduz às repulsões estéricas e colômbicas [3]. As SPIONs podem ainda ligar-se a uma variedade de fármacos, proteínas, enzimas, anticorpos ou outros alvos moleculares. O modo como as partículas são produzidas influencia as características mencionadas anteriormente [8]. Para controlar as propriedades da superfície das SPIONs, elas são revestidas por um polímero biocompatível durante ou após o processo de síntese, para prevenir a formação de grandes agregados, alterações da estrutura original e a biodegradação quando são expostas ao sistema biológico [3].

A biocompatibilidade e a não toxicidade das SPIONs são outros critérios igualmente importantes quando se trata de aplicações biomédicas. Os parâmetros que determinam a biocompatibilidade e a toxicidade são da natureza do componente magnético responsável (ferro, níquel, cobalto...) e do tamanho final das partículas, incluindo o seu núcleo e revestimento. Idealmente devem apresentar elevada magnetização para que o seu movimento, no sangue, possa ser controlado por um campo magnético e para que possam ser imobilizadas perto do “tecido patológico alvo” [3]. Para que as mNPs possam ser biocompatíveis e não tóxicas devem ser revestidas com uma camada de superfície, como por exemplo, com um polímero biocompatível como o quitosano.

A aplicação bem sucedida das SPIONs, no campo da saúde, está fortemente dependente das suas características estruturais, tais como a capacidade de controlar o tamanho e a distribuição do tamanho, a forma uniforme, a forte suscetibilidade magnética e uma superfície química desejada [8].

As mNPs produzidas ao longo deste trabalho visam a aplicação posterior em tratamento de cancro.

## 1.2. Magnetite

De todos os óxidos de ferro, a magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), que apresenta coloração preta, possui as propriedades mais interessantes, devido à presença de cátions de ferro em dois estados de valência, Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, em estrutura de espinela inversa [4].

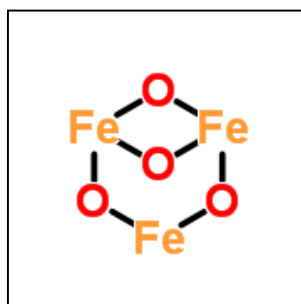


Figura 1.3 – Estrutura da magnetite (obtida de [33]).

Na magnetite, a magnetização decorre entre o movimento eletrónico dos iões Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> que coexistem nos sítios octaédricos [5].

A magnetite é um material ferromagnético devido à junção anti-ferromagnética entre o Fe<sup>3+</sup>, na sua estrutura de espinela inversa. Contudo, à nano-escala (<20 nm), as NPs de óxido de ferro são superparamagnéticas (à temperatura ambiente), ou seja, devido à redução do seu tamanho, a partícula comporta-se como um único dipolo magnético, possuindo assim um elevado momento magnético. Em consequência, estas NPs são facilmente magnetizáveis sob a aplicação de um campo magnético externo e não se magnetizam quando esse campo é removido [6], podendo, portanto, evitar a aglomeração das partículas e a formação de êmbolos nos capilares [32].

## 1.3. Aplicações das mNPs no tratamento de cancro

O cancro é caracterizado por uma diminuição ou perda de controlo celular e os mecanismos de maturação normais. As suas características incluem crescimento excessivo de células, células e

tecidos indiferenciados, e a capacidade de metástase. A escolha de tratamento inclui a remoção completa do tecido tumoral e, possivelmente, parte dos tecidos adjacentes, a quimioterapia, imunoterapia, radioterapia, e uma combinação destes. Uma vez que a completa erradicação de células de cancro é imprescindível para o sucesso do tratamento, a ablação total é o tratamento de escolha, se aplicável. No entanto, dependendo da localização e do envolvimento do tumor com os tecidos circundantes, a cirurgia pode não ser sempre possível. Sob tais circunstâncias, torna-se necessário recorrer à radioterapia ou quimioterapia <sup>[34]</sup>.

No entanto, têm vindo a ser relatadas complicações graves com estes tratamentos. Portanto, o desenvolvimento de técnicas que podem destruir as células tumorais, sem a destruição concomitante dos tecidos saudáveis do organismo, é atualmente uma das áreas mais ativas de pesquisa do cancro <sup>[34]</sup>.

### **1.3.1. Libertação de fármacos**

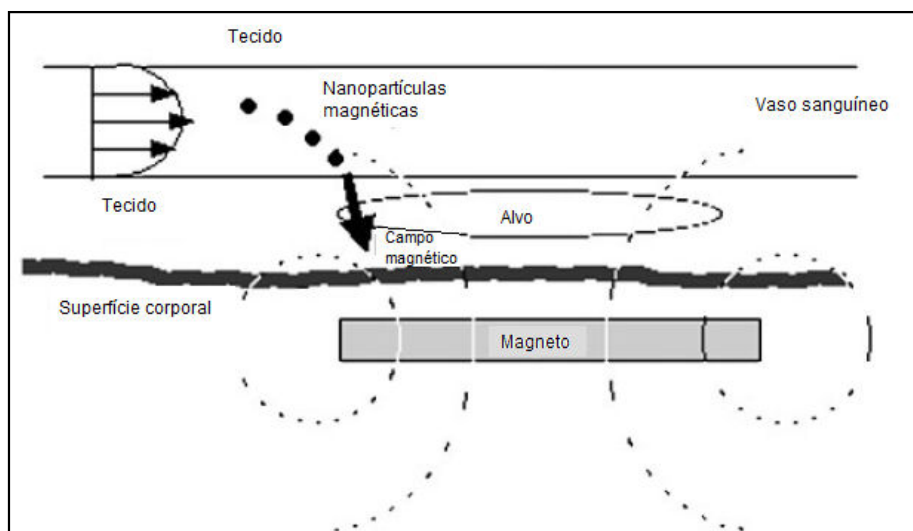
Sabe-se que a quimioterapia é uma forma eficaz de tratamento contra células tumorais, mas, uma vez que é administrada via intravenosa, todos os órgãos estão sujeitos aos seus efeitos nefastos e, portanto, os efeitos tóxicos são frequentemente graves e devastadores para o paciente <sup>[35]</sup>.

A ideia de libertação controlada de substâncias biologicamente ativas começou a ser utilizada na década de 50. As vantagens de sistemas de libertação controlada incluem: libertação localizada de fármacos num compartimento particular do corpo, diminuindo, dessa forma, o nível sistémico do fármaco; manutenção de níveis constantes de medicamento no organismo, implicando numa eficiência maior na utilização do agente (ou seja, é necessário menor teor de medicamento para produzir o mesmo efeito que os sistemas convencionais); preservação dos medicamentos que são rapidamente destruídos pelo corpo (isso é particularmente importante para moléculas biologicamente sensíveis, tais como proteínas) e, menor frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento <sup>[36]</sup>.

A utilização de mNPs como agentes de libertação de fármacos é uma abordagem de tratamento promissora, principalmente para fármacos quimioterapêuticos. Os principais problemas associados aos fármacos quimioterapêuticos são a sua não-especificidade e resistência celular. Com um transportador de fármaco é possível superar esses problemas. Neste caso, o tamanho, carga e superfície química das mNPs são particularmente importantes, uma vez que afetam o tempo de circulação no sangue e a biodisponibilidade das mNPs <sup>[30]</sup>.

Nesta aplicação, a mNP é revestida e fornece o medicamento a locais específicos do corpo. Na prática, o fármaco incorporado na nanopartícula é transportada para o local específico do corpo humano através da aplicação de um campo magnético externo. A força física criada pelo campo magnético externo ajuda a transportar as partículas através da parede vascular, posicionando e retendo o fármaco junto das células tumorais (figura 1.4). Isto permite que doses maiores do

medicamento anticancerígeno sejam entregues às células tumorais, mantendo o medicamento no local por longos períodos de tempo <sup>[35]</sup>.



**Figura 1.4 – Esquema representativo de um sistema de libertação de fármacos através de mNPs utilizando um campo magnético externo para direcionar as mNPs para o local do tumor (obtida de <sup>[37]</sup>).**

Do ponto de vista do transporte de fármacos no organismo, não existe nenhuma limitação prática quando o diâmetro de NPs típicas tem uma dimensão menor do que o diâmetro da seção cruzada do capilar mais estreito (que é cerca de 2  $\mu\text{m}$ ). Na realidade, para um transporte eficiente, as nanopartículas devem ser menores que 300 nm <sup>[36]</sup>.

A entrega de fármacos com recurso a mNPs pode melhorar o resultado da quimioterapia, uma vez que permite que uma fração máxima de medicamento interaja exclusivamente com as células tumorais sem efeitos adversos para as células normais, e uma vez que permite a distribuição preferencial do medicamento para as células cancerígenas <sup>[34]</sup>.

### 1.3.2. Ressonância Magnética de Imagem

A Imagem de Ressonância Magnética (IRM) é uma técnica não invasiva de diagnóstico, utilizada no estudo de tumores, lesões de tecidos ou na identificação de tipos específicos de células do corpo <sup>[6]</sup>, diferenciando tecido normal e patológico através das propriedades de relaxação dos átomos de hidrogénio na água <sup>[8]</sup>. Para facilitar o processo de diferenciação entre os tecidos, foi necessário o desenvolvimento de agentes que aumentassem o contraste <sup>[36]</sup>.

As mNPs já são utilizadas como agentes de contraste em IRM, para deteção de cancro, diagnóstico e monitorização do tratamento <sup>[30]</sup> e provam ser um bom substituto para o complexo de gadolínio (agente de contraste tipicamente utilizado em IRM) <sup>[8]</sup>. As nanopartículas de óxido de ferro têm sido utilizadas como agentes de contraste em IRM devido às suas propriedades de



encurtamento de T<sub>2</sub> (tempo de relaxação transversal, spin-spin, referente à componente do vetor magnetização, perpendicular ao campo magnético aplicado) e T<sub>2</sub>\* (curto tempo de relaxação transversal) <sup>[36]</sup>.

A aplicação de mNPs em IRM depende do seu tamanho. As partículas com diâmetros superiores a 50 nm são capturadas pelo RES assim que são injetadas no organismo, o que as torna adequadas para a imagiologia do fígado ou baço <sup>[8]</sup>. A magnetite revestida com dextrano, por exemplo, tem um tamanho médio de 80 nm e tem sido clinicamente provado que é um agente de contraste específico para o fígado. Estas partículas apresentam tempo de meia-vida curto, que é o tempo característico para a eliminação de material estranho no sangue pelo RES <sup>[36]</sup>. As partículas com diâmetros inferiores a 50 nm têm um tempo de meia-vida longo (superior a 2 horas) e permanecem na circulação sanguínea tempo suficiente para serem usadas como agentes de contraste na angiografia por ressonância magnética <sup>[8]</sup>.

A administração intravenosa é o método mais efetivo para libertar agentes de contraste, pois todas as células vitais recebem os agentes através da circulação sanguínea. Além disso, permite a libertação controlada de um fármaco adequado ao tratamento de órgãos doentes num local específico. Para marcação de tumores com mNPs, um aspeto importante que tem de se levar em conta é a limitação de tamanho das NPs para sistemas injetáveis. A maioria dos locais é acessível através da microcirculação pelos capilares sanguíneos ou através de poros presentes em várias superfícies e membranas. A maioria das aberturas é de tamanho nanométrico, logo, com o uso de NPs, é possível alcançar o nível subcelular <sup>[36]</sup>.

As mNPs permanecem no tecido por períodos mais longos em comparação com agentes de contraste comuns. Isto traz o benefício de reduzir a quantidade de agentes de contraste a ser administrada ao paciente, minimizando, assim, os efeitos tóxicos adversos. Além disso, as mNPs são mais seletivas e mais específicas do que outros agentes de contraste, o que melhora os resultados de IRM <sup>[6]</sup> e proporcionam uma melhor diferenciação entre tecido saudável e patológico <sup>[30]</sup>.

Devido ao seu revestimento, as mNPs possuem mais tempo de circulação no sangue, o que melhora a eficácia na deteção de células tumorais. Além disso, possibilidade de adicionar grupos funcionais bioativos na superfície dessas partículas (como anticorpos, enzimas, etc.) permite que as mNPs tenham uma célula alvo específica no organismo <sup>[6]</sup>.

### 1.3.3. Hipertermia

As SPIONs desempenham um papel importante no desenvolvimento da hipertermia para o tratamento de tumores <sup>[32]</sup>.

A hipertermia é um procedimento terapêutico usado para aumentar a temperatura de uma região do corpo afetado por um tumor maligno (cancro). É uma técnica antiga, experimentada pela primeira vez por Hipócrates (460-370 a.C.), pai da medicina, propondo que se tratassem tumores superficiais por cauterização com ferro quente <sup>[30]</sup>. Hipócrates acreditava que qualquer doença

poderia ser curada pelo aquecimento do corpo do paciente. Dentro desta filosofia, desde 1957 a hipertermia, uma modalidade de tratamento de cancro com elevação de temperatura entre 41 e 45°C com um tempo de tratamento de no mínimo 30 minutos, tem ganho considerável atenção devido a sua eficácia clínica, tal como para minimizar efeitos locais clínicos e a eventual possibilidade de destruir seletivamente tumores malignos localizados ou profundamente enraizados <sup>[36]</sup>. A utilização da hipertermia no tratamento de tumores tem como base o facto de a uma temperatura entre 42°C a 45°C as células tumorais morrerem <sup>[38]</sup>. A esta temperatura, as células tumorais morrem, preferencialmente, porque são células que vivem em condições de hipoxia, ou seja, com baixa quantidade de oxigénio. Quando a temperatura é aumentada, estas células não têm a capacidade de manter um pH adequado à sua sobrevivência (porque este já é naturalmente ácido devido à falta de oxigénio) e, portanto, morrem preferencialmente.

Além disso, os tumores são mais facilmente aquecidos do que os tecidos normais vizinhos. Desta forma, a hipertermia é um tratamento de cancro útil com poucos efeitos secundários locais <sup>[36]</sup>. A combinação de hipertermia com métodos específicos para a deteção de células tumorais é bastante vantajosa para tumores inoperáveis, pois, nestes casos, as opções de tratamento são limitadas. Neste tipo de tumores, a utilização de hipertermia magnética através das NPs magnéticas pode produzir um resultado mais eficaz e trazer menos efeitos secundários <sup>[2]</sup>.

Outra vantagem da hipertermia magnética é o facto de o aquecimento ser restrito somente à região do tumor. De mencionar também que o potencial de aquecimento, nesta terapia, está fortemente relacionado com o tamanho e forma das NPs <sup>[7]</sup>.

O Instituto Nacional de Cancro, nos EUA <sup>[39]</sup> reconhece três tipos diferentes de hipertermia: i) hipertermia local, em que o calor é aplicado numa pequena área, como um tumor, recorrendo a diversas técnicas de distribuição de energia (como micro-ondas, radiofrequências e ultrassons), que aquecem o tumor; ii) hipertermia regional, em que o calor é aplicado a grandes superfícies de tecido; iii) hipertermia por todo o corpo, que é aplicada para tratar cancro espalhado por todo o corpo <sup>[30]</sup>.

A hipertermia dos fluidos magnéticos envolve a dispersão de partículas magnéticas através do “tecido-alvo”. As NPs magnéticas são colocadas dentro do tumor através de uma injeção direta ou através de um anticorpo tumoral específico, depois de o tumor ser exposto a um campo magnético alternado com força e frequência suficientes para causar aquecimento das partículas. Este campo magnético faz com que as partículas gerem calor através dos mecanismos de relaxação magnéticos <sup>[30]</sup>.

A aplicação clínica da hipertermia ainda não está estabelecida como um tratamento isolado, mas como uma forma de melhorar os resultados da quimioterapia e radioterapia, quando aplicada repetidamente em curtos intervalos. Atualmente, a hipertermia está aprovada para cancros em estados avançados (cancro rectal recorrente, cancro na próstata, no útero, no pescoço e cabeça, nos pulmões e na mama) em conjugação com quimioterapia e radioterapia <sup>[30]</sup>.



## 2. Métodos de síntese de mNPs

Métodos físicos, como deposição de fase gasosa e litografia por feixe de eletrões, são procedimentos elaborados e que sofrem de incapacidade de controlar o tamanho das partículas na gama de tamanho nanométrico. Os procedimentos químicos de síntese de nanopartículas magnéticas são mais simples e mais eficientes no controlo de tamanho, composição e, por vezes, forma das nanopartículas [2].

Segundo um estudo realizado por Mahmoudi e os seus colegas, em 2011 [3], cerca de 90% das mNPs são sintetizadas através de procedimentos químicos. Estes procedimentos têm merecido particular atenção uma vez que permitem a síntese de partículas de tamanho e forma quase uniformes. Este objetivo tem sido atingido por vários métodos de síntese de nanopartículas de óxido de ferro, sendo os mais utilizados a precipitação química, a microemulsão, a síntese hidrotermal e a decomposição térmica. A magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), magmite (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e hematite (α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) são os três principais óxidos de ferro que compõem a categoria das SPIONs [3], mas este trabalho focou-se, somente, na produção de magnetite, devido às suas vantagens nas aplicações biomédicas em comparação com os outros 2 óxidos de ferro.

Neste capítulo abordam-se os conceitos teóricos dos métodos de síntese das mNPs.

### 2.1. Precipitação Química

O método da precipitação química é o caminho químico mais simples, rápido e barato para a obtenção de mNPs. A coprecipitação dos sais de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> com uma solução alcalina é a mais comum, devido à baixa temperatura de reação necessária e às propriedades hidrofílicas da superfície das partículas resultantes [8]. O controlo do tamanho, forma e composição das NPs depende do tipo de sais utilizados (cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), da razão entre Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, do pH, da força iónica do meio [2], do tipo de agente precipitante [35] e da força da base usada [1]. O controlo destes parâmetros permite a formação de nanopartículas com uma distribuição de tamanho grande (maior que 30% do tamanho médio de partícula) e aproximadamente esféricas. A concentração dos sais de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> presentes na mistura inicial da reação tem o maior efeito sobre o tamanho global das NPs. Baixas concentrações resultam num crescimento das partículas limitado, embora as partículas resultantes sejam, geralmente, mais uniformes em tamanho. Quando a concentração dos sais é aumentada, existe um aumento do crescimento das partículas, com uma subsequente perda de uniformidade de tamanho [35].

A primeira síntese de NPs magnéticas utilizando a técnica da precipitação alcalina foi realizada por Massart [40]. O processo de Massart descreve a coprecipitação de cloretos de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> numa

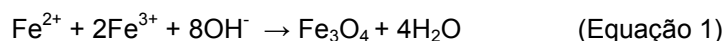
solução alcalina. Após o trabalho pioneiro de Massart, o método da coprecipitação foi amplamente estudado para a síntese de NPs de magnetite, devido às suas extraordinárias vantagens. De facto, hoje em dia praticamente todas as NPs de magnetite utilizadas em pesquisas clínicas são preparadas pelo método da coprecipitação, devido ao facto da sua superfície se poder modificar facilmente para hidrofílica, o que é adequado para aplicações biomédicas <sup>[41]</sup>.

Em 1992, Jolivet e equipa demonstram que a razão entre Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> influencia o resultado final das NPs. Valores baixos desta razão (<0.3) formavam goethite (FeO(OH)); para proporções entre 0.3 e 0.5 surgiam duas fases, constituídas por partículas de menor (4 nm) e maior dimensão. No entanto, a razão de 0.5 correspondeu a magnetite estequiométrica, sendo as partículas resultantes homogéneas em tamanho e composição <sup>[42]</sup>. Wei e colegas demonstram que a razão molar entre Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> deveria ser mantida em 1:2 pois assim obtêm-se partículas de magnetite com qualidade mais elevada <sup>[43]</sup>. Também Babes e a sua equipa, em 1999, investigaram diferentes propriedades tais como a concentração dos sais de ferro, temperatura e oxigénio, salientando que o parâmetro mais importante era a razão molar entre Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>. Uma razão elevada produzia partículas maiores, sugerindo que somente razões entre 0.4 e 0.6 produziam partículas monodispersas, adequadas para utilizar como agentes de contraste em imagem de ressonância magnética <sup>[44]</sup>.

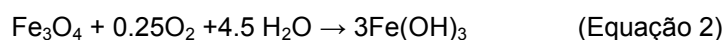
Em 2010, Lodhia e a sua equipa concluíram que o tamanho das NPs está relacionado com o pH e/ou a razão entre Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> <sup>[1]</sup>. Kim e investigadores comprovaram que, com um intervalo de pH entre 1 e 4, o Fe<sup>3+</sup> poderia condensar como goethite (FeO(OH)) e que a magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) deveria ser obtida com um pH entre 9 e 14 <sup>[45]</sup>.

Em 2006, Sun e seus colaboradores provaram que a temperatura de reação influencia o tamanho final das mNPs. Segundo estes investigadores, as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> reduzem o seu tamanho com o aumento da temperatura, quando a temperatura de reação era inferior a 50°C, e aumentavam o seu tamanho com o aumento da temperatura, quando esta era superior a 50°C <sup>[46]</sup>. Em relação ao método experimental, convencionalmente, a magnetite é preparada adicionando uma base à mistura aquosa de cloretos de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, numa razão molar de 1:2 <sup>[8]</sup> e com um pH entre 9 e 14 <sup>[1]</sup>. O precipitado de magnetite surge com uma coloração preta.

A reação global pode ser descrita da seguinte forma:



De acordo com a termodinâmica desta reação, era esperada uma precipitação completa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> num pH entre 9 e 14, mantendo uma razão molar de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> de 1:2 sobre um ambiente não oxidante e livre de oxigénio. Contudo, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pode oxidar, como descrito na reação seguinte <sup>[2]</sup>:



Os iões podem ser oxidados antes da precipitação, afetando as propriedades físicas e químicas das mNPs <sup>[1]</sup>. A reação deve, portanto, ser realizada sob um ambiente anaeróbio, por forma a eliminar o oxigénio. Borbulhar um gás inerte através da solução não só protege a oxidação crítica da magnetite, mas também reduz o tamanho da partícula, quando comparado com os métodos que não removem o oxigénio <sup>[2]</sup>. De realçar que não se consegue evitar completamente a oxidação das mNPs, durante a sua síntese <sup>[4]</sup>, mas pode ser limitada.

No caso da magnetite, a oxidação, normalmente, significa a formação de magmite <sup>[1]</sup>. A transformação de magnetite para magmite pode representar um problema sério. Os dois diferem entre si na estrutura cristalográfica: na magnetite, os iões de ferro ocupam posições maioritariamente octaédricas (no octaedro, os espaços estão todos preenchidos pelos iões de ferro); na magmite, existem vazios iónicos na posição octaédrica (no octaedro, existem espaços vazios, que podem ser preenchidos por catiões). Esta estrutura cristalina resulta numa magnetização espontânea diferente para as partículas de ferro: a 300K, 92 emu/g para a magnetite e 78 emu/g para a magmite <sup>[1]</sup>.

A principal vantagem das reações de precipitação química é que podem ser sintetizadas grandes quantidades de nanopartículas <sup>[35]</sup>. No entanto, apesar do método da coprecipitação ser o mais simples e a via química a mais eficiente para obter NPs magnéticas, também apresenta desvantagens <sup>[1]</sup>. A reação de precipitação, em meio aquoso, para sintetizar NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> já é investigada há mais de 20 anos, mas as dificuldades que surgem na síntese com este método ainda permanecem, incluindo o controlo do tamanho da partícula, a distribuição do tamanho, a fase resultante <sup>[41]</sup>, a baixa cristalinidade e a agregação <sup>[1]</sup>. Segundo Kim e os seus colaboradores, a agregação das partículas pode ser justificada pela existência de interações *van der Waals* entre as mesmas <sup>[47]</sup>. Contudo, Maity e a sua equipa sugerem que o principal motivo de agregação das partículas é a interação magnetostática, como resultado da interação dipolo-dipolo <sup>[48]</sup>.

## 2.2. Microemulsão

Desde a sua introdução, em 1943 por Hoar e Schulman, as microemulsões têm atraído considerável atenção com vista do seu uso em muitos produtos, tais como substitutos de sangue ou solventes de fármacos hidrofóbicos. Neste último ramo, elas atuam incrementando a solubilização, dissolução e biodisponibilidade de fármacos <sup>[49]</sup>.

O termo de emulsão é aplicado a uma mistura de pelo menos três componentes: uma fase de óleo, uma fase aquosa e uma superfície de espécies ativas, designadas surfactantes. Por vezes, um quarto componente também está presente, designado co-surfactante <sup>[50]</sup>.

As diferenças entre microemulsões e emulsões são mais do que simples semântica, apesar de recentemente se utilizarem estes termos alternadamente. Na tabela seguinte encontram-se as principais diferenças entre uma microemulsão e uma emulsão.

**Tabela 2.1 – Comparação entre microemulsões e emulsões (adaptado de <sup>[49]</sup>).**

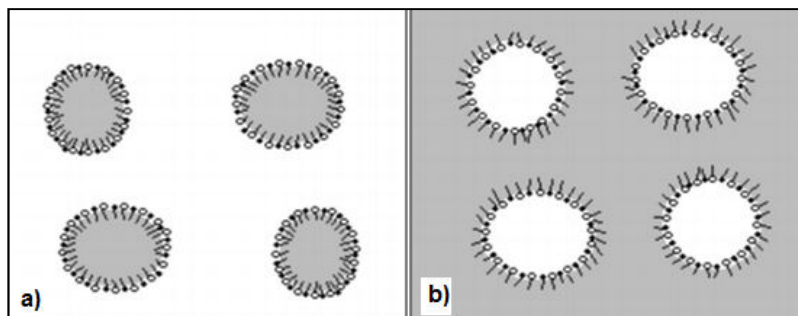
	Microemulsão	Emulsão
<b>Tamanho das gotículas dispersas</b>	10 – 300 nm	1 – 10 µm
<b>Aparência</b>	Transparente e translúcida	Turva e leitosa
<b>Estabilidade</b>	Termodinamicamente estável	Termodinamicamente instável
<b>Tensão interfacial</b>	Muito baixa	Alta
<b>Quantidade de surfactante</b>	Alta	Baixa

A tensão interfacial de uma microemulsão é muito baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão. Isso pode levar a formação espontânea das microemulsões e, consequentemente, a um pequeno tamanho das gotículas (tamanho à nano-escala). As emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica. Também devido ao pequeno tamanho das gotículas, ao contrário das emulsões, as microemulsões são termodinamicamente estáveis. O tamanho da gotícula de microemulsão é muito reduzido, tipicamente entre 10-300 nm, aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1-10 µm. Por essa razão, as microemulsões são relativamente translúcidas, ou seja, opticamente límpidas, o que se justifica pelo fato de o diâmetro médio das gotículas ser menor do que  $\frac{1}{4}$  do comprimento de onda da luz incidente. Com isso, as mesmas não espalham luz e o sistema fica transparente <sup>[49]</sup>.

Para a formação de uma microemulsão, é necessário que ocorra a mistura de dois líquidos imiscíveis. Inicialmente, quando estes dois líquidos são agitados mecanicamente, um deles é disperso no interior do outro. Se um surfactante for adicionado ao sistema, o mesmo tende a estabilizar-se, formando um sistema homogêneo com a formação de uma fase interna, dispersa ou descontínua. Sem a adição do surfactante, o sistema tende a separar as fases e é possível visualizar novamente os dois líquidos separados <sup>[49]</sup>.

O método da microemulsão pode ser dividido em duas categorias, baseado na utilização de uma fase contínua orgânica ou aquosa. No método de fase contínua orgânica, as moléculas hidrossolúveis estão localizadas no interior de reduzidas gotículas esféricas de água e envolvidas por moléculas de surfactante num meio contínuo de óleo. A fase aquosa é a interna, dispersa ou descontínua, ao passo que o óleo compõe a fase externa, dispersante ou contínua. Nesses casos, o sistema é conhecido como A/O <sup>[49]</sup>. Apesar de este método ter sido um dos primeiros a ser utilizado para a produção de NPs, tem tido pouca importância, pois requer a utilização de solventes orgânicos tóxicos e surfactantes, os quais são subsequentemente eliminados das NPs <sup>[51, 52, 53]</sup>. Inversamente, quando moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior de reduzidas

gotículas esféricas de óleo e envolvidas por moléculas de surfactante num meio contínuo de água, esse sistema é conhecido como O/A <sup>[49]</sup>. Este tipo de formulação é especialmente vantajoso para a administração de fármacos lipossolúveis (por exemplo, vitaminas, hormonas, etc.) por via intravenosa.



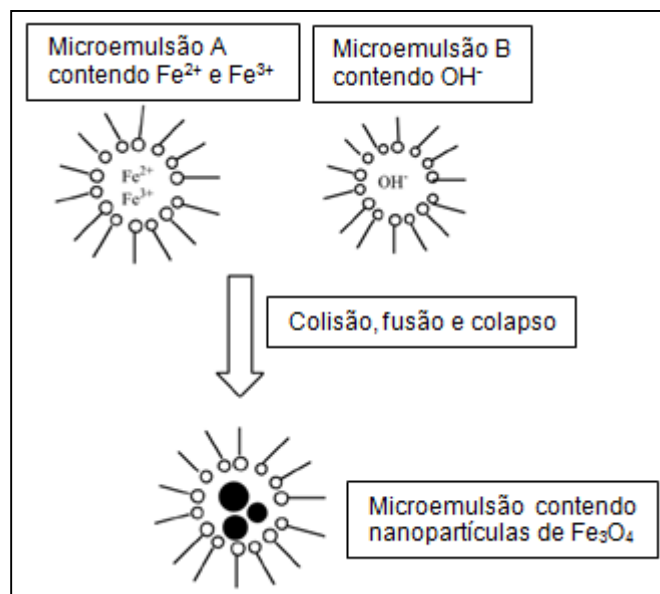
**Figura 2.1 – Tipos de microemulsões esquematizadas pela fase oleosa (cinza), fase aquosa (branca) e filme interfacial de surfactante; a) Microemulsão O/A; b) Microemulsão A/O (retirado de <sup>[49]</sup>).**

As microemulsões ‘água-em-óleo’ (designadas por A/O, que significa água em óleo) são transparentes, isotrópicas e termodinamicamente estáveis em meios líquidos <sup>[7]</sup>. Nas microemulsões A/O, a fase aquosa é dispersa como microgotículas (tipicamente de 1-50 nm) rodeadas por uma monocamada de surfactantes, numa fase contínua de hidrocarbonetos <sup>[2]</sup>. Quando um sal de metal solúvel é incorporado na fase aquosa da microemulsão, este permanece nas microgotículas aquosas, rodeado por óleo. Estas microgotículas vão colidir continuamente, unir-se e voltar a quebrar <sup>[54]</sup>. Conceptualmente, quando os reagentes A e B são dissolvidos em duas microemulsões A/O idênticas, vão formar um precipitado AB, numa mistura. O precipitado final produzido pode ser extraído dos surfactantes <sup>[2]</sup>. As microemulsões A/O têm sido apresentadas como sendo um método adequado, versátil e simples de preparar nanopartículas e estas são as características que podem tornar este método útil tanto para aplicações *in vivo* como *in vitro* <sup>[7]</sup>.

Recentemente, recorreu-se à microemulsão A/O para sintetizar mNPs, com tamanho inferior a 15 nm <sup>[8]</sup>, com propriedades físicas e químicas uniformes <sup>[2]</sup>. Pérez e equipa produziram NPs com tamanho inferior a 15 nm <sup>[55]</sup>, Gupta e seus colaboradores sintetizaram NPs com tamanhos médios entre 10 e 15 nm de diâmetro <sup>[56]</sup> e Pileni e equipa produziram NPs com tamanhos médios que variavam de 4 a 12 nm <sup>[57]</sup>.

Com o método da microemulsão, podem produzir-se SPIONs homogéneas <sup>[8]</sup>, como se ilustra na figura seguinte:





**Figura 2.2-** Esquema ilustrativo da coprecipitação de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> via microemulsão A/O (adaptado de <sup>[8]</sup>).

Porém, por vezes, podem surgir camadas não desejáveis nas microemulsões, camadas não magnéticas. Pérez e colegas atribuíram a existência destas camadas a dois fatores: i) dentro das microgotas da solução de água, na microemulsão, existe uma distribuição não homogênea do pH e da constante dielétrica (aspeto que pode ter grande influência sobre a formação das partículas que conduzem a fases amorfas); ii) a elevada razão superfície/volume das NPs obtidas, devido ao seu pequeno tamanho, favorece a presença de quantidades importantes de fases com grau de cristalinidade baixo nas suas superfícies <sup>[55]</sup>. Já Lee e colaboradores justificaram a presença destas camadas devido à inclinação dos spins de superfície, uma camada anisotrópica espessa, ou perda da ordem de longo alcance na camada superficial <sup>[58]</sup>.

As moléculas de surfactante presentes na microemulsão proporcionam um efeito de confinamento que limita a nucleação da partícula, o seu crescimento e a sua aglomeração <sup>[59]</sup>. Nesta técnica, geralmente utilizam-se surfactantes de baixo peso molecular <sup>[50]</sup>. O primeiro e também o mais utilizado sistema de surfactantes usado na síntese de NPs magnéticas foi o Aerossol OT ou AOT (dioctilsulfocinato de sódio). Outros sistemas, como CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), SDS (dodecilsulfato de sódio) e polietoxilatos (Igepal, Brij, Tween, C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>) também têm sido utilizados. Além destes, ainda outros estão a ser desenvolvidos no sentido de otimizar os parâmetros morfológicos e químicos. Muitas das reações levadas a cabo em micelas são bastante semelhantes às que ocorrem nas reações aquosas, porém com um maior controlo no que respeita à agregação das partículas, devido ao sistema de surfactantes <sup>[35]</sup>.

Uma vez que as moléculas de surfactantes possuem duas partes com capacidades de solubilização opostas, vão apresentar características únicas como por exemplo a tendência para ser adsorvidas nas superfícies e interfaces, resultando numa diminuição da tensão superficial e na

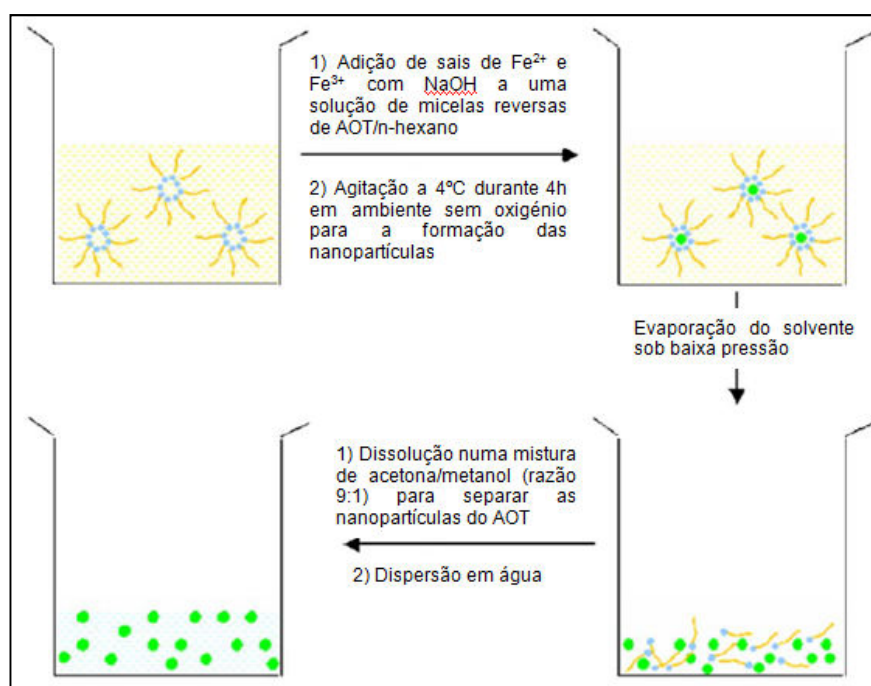
formação de agregados dentro das soluções (formação de microemulsões). Tais agregados podem solubilizar o óleo numa fase aquosa (micelas) ou a água numa fase de óleo (micelas reversas) <sup>[50]</sup>.

As micelas podem formar-se na presença ou ausência de água. No caso das micelas reversas compostas por hidrocarbonetos, a água pode ser solubilizada <sup>[35]</sup>. Neste caso, a coprecipitação ocorre em pequenas gotículas de água (chamadas *water pools* ou “piscinas de água”) <sup>[59]</sup>, rodeadas por surfactante, distribuídas de forma homogênea numa fase de óleo. Estas *water pools* atuam como micro-reatores na formação de nanopartículas e são termodinamicamente definidas pela razão molar água-surfactante <sup>[50]</sup>. Segundo estudos levados a cabo por Liang e seus investigadores, o tamanho do núcleo de água é dependente da razão água/surfactante, R. Caso R se mantenha constante, o tamanho do núcleo de água mantém-se inalterável; se R aumentar, verifica-se um aumento do tamanho desse núcleo de água. Para R=3, as partículas apresentam tamanho médio de 10 nm, com bastante aglomeração; para R=5, as NPs têm tamanho médio de 20 nm e apresentam aglomeração local; para R=6, as NPs têm tamanho médio de 22 nm e os núcleos de água estão dispersos uniformemente; para R=7, as NPs formadas agregam-se esfericamente e há interações entre os núcleos de água “vizinhos” (aumentam muito de tamanho, diminuindo, desta forma, o espaço livre entre os núcleos de água, aumentando, portanto, este tipo de interações) <sup>[60]</sup>. As primeiras NPs magnéticas formadas a partir da microemulsão inversa foram obtidas a partir da oxidação de sais de Fe<sup>2+</sup> <sup>[1]</sup>, para formar Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Esta reação foi levada a cabo por um sistema AOT-isooctano e formou NPs esféricas com pequena dispersão de dimensão <sup>[35]</sup>. Lee e colegas demonstraram que o tamanho das partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> era controlado pela variação da temperatura e esses estudos foram confirmados por outros investigadores <sup>[61]</sup>. Segundo um estudo realizado por Liang, em 2010, a fim de verificar a influência da temperatura nas NPs formadas, a 30°C as partículas apresentavam-se bem dispersas e com tamanho uniforme, entre 10-20 nm. A 60°C, as partículas denotavam alguma aglomeração e, a 80°C as partículas encontravam-se bastante aglomeradas. Os autores explicam a agregação como sendo devida à sobre-elevada temperatura, o que leva as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a aumentar de tamanho, conduzindo a uma aglomeração das mesmas <sup>[60]</sup>. Lee e equipa investigaram também o papel da concentração dos surfactantes na morfologia das NPs obtidas. Verificaram que, variando a razão entre o solvente polar utilizado e o surfactante em estudo, o tamanho final das NPs também varia. Neste caso particular, à medida que esta razão aumentava, o tamanho das NPs produzidas aumentava também. Para razões de 3.6, 5.8, 6.5 e 8.1 obtiveram nanopartículas de 3 nm, 5 nm, 7 nm e 9 nm, respetivamente <sup>[61]</sup>. Segundo um estudo levado a cabo por Mori e seus investigadores, o tamanho da partícula também é influenciado pelo tipo de solvente utilizado. Segundo este investigador, as partículas produzidas em ciclohexano apresentavam-se mais pequenas do que as produzidas num sistema de octano, concluindo, assim, que a alteração no crescimento depende do comprimento da cadeia das moléculas do solvente. Com o aumento do comprimento da cadeia, as moléculas alcanas tornam-se cada vez mais enroladas, e a sua

penetração na camada de surfactante torna-se mais difícil. Desta forma, a interação entre o surfactante e a molécula de solvente diminui com o aumento do comprimento da cadeia das moléculas alcanas<sup>[62]</sup>.

Atualmente, estudos sugerem que mNPs sintetizadas pelas micelas inversas podem ser utilizadas em aplicações de imagem de ressonância magnética<sup>[1]</sup>.

Comparando com o método simples da co-precipitação aquosa, o método da microemulsão apresenta algumas vantagens, devido ao tamanho reduzido das microemulsões (alguns nanómetros), atuando como um nanoreactor, confinando nucleação das nanopartículas e crescimento. Este método produz partículas de óxido de ferro monodispersas, com um melhor controlo na distribuição do seu tamanho<sup>[8]</sup>, mais pequenas e mais uniformes<sup>[55]</sup>. Tang e seus colaboradores demonstraram que as partículas mais pequenas e mais uniformes eram preparadas pela precipitação da magnetite a baixas temperaturas, na presença de azoto gasoso (figura seguinte)<sup>[63]</sup>:



**Figura 2.3- Estratégia de preparação de SPIONs monodispersas dentro de gotas de microemulsão A/O. Os sais de ferro são dissolvidos dentro dos núcleos aquosos das micelas e precipitam através da solução alcalina, para obter partículas com o tamanho desejado (adaptado de<sup>[2]</sup>).**

Porém, a microemulsão também apresenta algumas desvantagens. A sua desvantagem principal é a toxicidade dos solventes orgânicos, sendo prejudicial para as aplicações biomédicas. Para além disso, é muito difícil dimensionar-se, devido à enorme quantidade de óleo requerida (fase orgânica) e à dificuldade em remover os surfactantes que aderem às partículas<sup>[8]</sup>, e as NPs magnéticas sintetizadas pela microemulsão apresentam uma baixa cristalinidade<sup>[64]</sup>.

## 2.3. Síntese hidrotermal

O termo hidrotermal é puramente de origem geológica e geralmente refere-se a qualquer reação heterogénea na presença de solventes aquosos, sob alta pressão e sob condições de temperatura que dissolvem e recristalizam materiais que, em condições normais, são relativamente insolúveis. O geólogo britânico Roderick Murchison (1792-1871) usou este termo para descrever a ação da água, a elevada temperatura e pressão, que fez alterações na crosta terrestre e conduziu à formação de vários minerais. A versatilidade do processo hidrotérmico, devido principalmente ao papel da mineralização da água, é bastante evidente na forma como origina diversos minerais com variedade estrutural considerável <sup>[65]</sup>.

Nos últimos anos, o método hidrotermal tem sido desenvolvido para sintetizar nanopartículas por se tratar de um método simples de fabricar nanocristais a partir de soluções aquosas a elevadas temperaturas <sup>[66]</sup> (mais de 100°C) <sup>[67]</sup> e elevadas pressões <sup>[66]</sup> (mais de algumas atmosferas) <sup>[67]</sup>. Estudos anteriores sugerem que, se se trabalhar com temperaturas superiores a 160°C, é possível obter partículas com um tamanho mais elevado. A temperaturas inferiores, como 80°C ou 120°C, há tendência a obter partículas com um tamanho menor <sup>[67]</sup>. Além disso, a duração do processo de aquecimento também desempenha um papel importante na produção de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Mao e equipa sintetizaram NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a 180°C durante 24h e os seus resultados indicam que as nanopartículas produzidas apresentavam uma forma de cristal, bem definida, e eram maiores, devido à recristalização <sup>[68]</sup>. Por outro lado, Haw e colegas sintetizaram NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a 200°C durante 1h e os seus resultados indicam a obtenção de NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> esféricas e com um diâmetro médio de 17,22 ± 5 nm <sup>[67]</sup>. A duração do processo de aquecimento atua também ao nível da cristalinidade das nanopartículas. Mizutani e equipa demonstraram que, aumentando o período de aquecimento, a cristalinidade das nanopartículas, bem como o seu tamanho, aumentam também <sup>[64]</sup>.

Um dos parâmetros mais importantes na síntese hidrotermal é a razão molar entre os sais de ferro. Mizutani e equipa comprovaram que, quando esta razão é de 0,5, as NPs produzidas apresentam tamanho inferior e uma baixa cristalinidade. Por outro lado, quando a razão molar é superior a 1, o tamanho das NPs, assim como a sua cristalinidade, aumentam <sup>[64]</sup>.

Outro aspeto importante do método hidrotermal é a obtenção dos reagentes que, de outro modo, são difíceis de dissolver numa solução sob ação de solventes ou mineralizantes. Isto é semelhante às reações químicas de transporte, o que levou à definição de reações hidrotérmicas como um caso particular das reações químicas de transporte <sup>[65]</sup>.

A síntese hidrotermal envolve a água quer como um catalisador quer, ocasionalmente, como um componente de fases sólidas na síntese <sup>[66]</sup>. Muitas das propriedades físicas da água, tais como fugacidade, constante dielétrica, densidade, etc., sofrem alterações consideráveis ao longo do

processo hidrotermal devido às elevadas temperaturas <sup>[65]</sup>. A água funciona como um reagente nestas condições supercríticas, acelerando a cinética da hidrólise da água.

Este método utiliza autoclaves ou reatores de alta pressão, onde a pressão pode ser mais de 2000 psi e a temperatura superior a 200°C <sup>[35]</sup>. A autoclave é um cilindro de aço de paredes espessas selado hermeticamente com o intuito de resistir a elevadas temperaturas e pressões, por períodos prolongados de tempo.

A vantagem do método hidrotermal, quando comparado com os restantes, inclui a capacidade para criar fases cristalinas que não são estáveis no ponto de fusão e criar materiais que têm uma alta pressão de vapor perto dos seus pontos de fusão. Além disso, com esta técnica consegue-se controlar o tamanho, a forma, a composição química e a estequiometria das partículas <sup>[66]</sup>. O domínio do tamanho e da morfologia das partículas, neste método, deve-se a um controlo do tempo e da temperatura <sup>[35]</sup>. Outras vantagens passam pelo facto de, com este método, reagentes orgânicos são dispensados, elevado rendimento de produtos, relatividade custo-benefício, excelente cristalinidade das partículas com tamanho controlável e boa morfologia das mesmas. Além disso, não necessita de nenhum tratamento pós-aquecimento <sup>[67]</sup>.

## 2.4. Decomposição térmica

O método da decomposição térmica é um método bastante promissor para sintetizar mNPs monodispersas e de elevada qualidade <sup>[69]</sup>, o que é altamente desejável para o controlo das propriedades físico-químicas das nanopartículas <sup>[8]</sup>. Este método utiliza vários tipos de iões precursores, como Fe(acac)<sub>3</sub> (acetilacetato de ferro III), Fe(Co)<sub>5</sub> (pentacarbonil de ferro) e complexos de Fe(oleato)<sub>3</sub>, sob elevadas temperaturas <sup>[8]</sup>. Para obter um controlo preciso do tamanho das NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> formadas é necessário utilizar grandes quantidades de precursores tóxicos e de surfactantes no solvente orgânico, portanto, antes de serem utilizadas em aplicações biomédicas, as NPs necessitam de um tratamento de purificação <sup>[70]</sup>.

Tipicamente, o método da decomposição térmica envolve a decomposição de Fe(acac)<sub>3</sub> num solvente com elevado ponto de ebulição, na presença de surfactantes como ácido oleico e oleilamina <sup>[69]</sup>. É importante que a superfície das NPs seja funcionalizável, para facilitar a conjugação com o fármaco e encapsulá-lo com o polímero, de modo a formar um sistema de transporte do fármaco com a circulação, no sistema fisiológico. A ligação da oleilamina à superfície, que é adicionada durante a síntese química das NPs, torna-as hidrofóbicas <sup>[71]</sup>. Lee e equipa sintetizaram NPs de magnetite hidrofóbicas com uma camada de ácido oleico e oleilamina, obtendo nanopartículas com aproximadamente 11.7±1.5 nm de diâmetro, esféricas e uniformes <sup>[72]</sup>. Contudo, a superfície hidrofóbica das partículas obtidas limita as aplicações biomédicas, que requerem dispersão em água e biocompatibilidade. A modificação da superfície de tais partículas hidrofóbicas continua um desafio <sup>[8]</sup>. Zhen e equipa produziram SPIONs dispersíveis em água, a

elevada temperatura, usando 2-pirridona como agente de revestimento e como meio <sup>[73]</sup>. Woo e colaboradores modificaram a superfície das SPIONs (de 11 nm) de hidrofóbica para hidrofílica através da ligação covalente Fe-S com o bifuncional MPA (ácido 3-mercaptoprónico), e, posteriormente, o grupo terminal 'ácido carboxílico' foi esterificado de modo a melhorar a biocompatibilidade <sup>[74]</sup>.

O controlo do tamanho e forma das SPIONs produzidas pelo método da decomposição térmica dependem de parâmetros como concentração de sais de ferro, a duração de toda a reação e o surfactante escolhido, todos testados por Chin e colegas, em 2011. Esta equipa de investigadores sintetizou NPs de magnetite utilizando Fe(acac)<sub>3</sub> como precursor. Verificaram que, à medida que a concentração deste precursor aumentava, o tamanho das nanopartículas de magnetite aumentava também, sendo estas partículas de forma irregular e não-esféricas. Os mesmos investigadores sintetizaram NPs de magnetite com PEO e verificaram que aumentando o volume deste surfactante, as partículas obtidas apresentava, tamanho sucessivamente menor. O PEO atuou como surfactante e preveniu a aglomeração dos NPs de magnetite, e obtiveram partículas menos esféricas. Segundo estes investigadores, este facto pode dever-se à fraca interação do Fe(acac)<sub>3</sub> com as cadeias do PEO, uma vez que o PEO não possui nenhum grupo 'ácido carboxílico' (-COOH) para se ligar covalentemente ao Fe(acac)<sub>3</sub>. Estes investigadores testaram também a influência do ácido oleico e verificaram que, com este surfactante, as nanopartículas eram mais esféricas. Isto deve-se à presença de um grupo de 'ácido carboxílico' (-COOH) no ácido oleico, que vai permitir que se ligue covalentemente aos átomos do ferro. Porém, o tamanho das NPs, com a variação de concentração do ácido oleico, permaneceu igual, o que levou Chin e colegas a concluir que a concentração deste surfactante não tem efeito no tamanho médio das NPs formadas. Em relação à duração da reação, estes investigadores concluíram que, quanto maior o tempo de reação maiores e mais aglomeradas as partículas são. Para tempos de reação de 1h e 2h obtiveram NPs de 4 nm e 6 nm, respetivamente <sup>[70]</sup>.

## 2.5. Caracterização das mNPs

As propriedades magnéticas das mNPs dependem do seu tamanho, da sua forma, e da sua microestrutura. Há várias técnicas que são usadas para determinar o tamanho, a composição química e as propriedades da superfície magnética das NPs, tanto em suspensão como em estado seco. No entanto, é o tamanho em suspensão que é importante para as suas aplicações, uma vez que o tamanho em estado seco não inclui a camada de solvatação em torno das mNPs. Além disso, o processo de secagem pode ter um efeito na agregação das partículas <sup>[3]</sup>.

Entre as técnicas usadas para determinar o tamanho das partículas, existe o SEM (Microscopia Eletrónica de Varrimento), TEM (Microscopia Eletrónica de Transmissão), DLS (Dispersão

Dinâmica de Luz), que determinam o tamanho das NPs, e o DRX (Difração de Raios-X), que permite determinar as fases presentes e o tamanho da cristalite no seu estado seco <sup>[3]</sup>.

O SEM fornece informação acerca da estrutura da superfície das partículas, assim como da sua forma e tamanho. O TEM é a técnica mais poderosa para determinar o tamanho e a morfologia das partículas <sup>[3]</sup>, do núcleo e das monocamadas <sup>[1]</sup>, reportando o tamanho total da NP e fornecendo detalhes acerca da sua distribuição de tamanho e forma <sup>[32]</sup>. Em ambas as técnicas de microscopia eletrónica referidas, há a possibilidade de obter uma informação química das nanopartículas observadas, através da técnica de EDS (Espectroscopia por Dispersão em Energia).

A técnica de DLS fornece informação acerca do tamanho médio das partículas, baseado no volume e intensidade de distribuição <sup>[3]</sup>. É uma técnica útil, pois permite obter informação acerca do tamanho e distribuição do tamanho em menos tempo e com menor custo <sup>[1]</sup>, quando comparada com as técnicas anteriores, fazendo-o com as partículas em suspensão.

A difração de raios-X permite obter informação acerca da estrutura cristalina das partículas e determinar o tamanho das partículas. O tamanho do cristal é calculado a partir da fórmula de Scherrer <sup>[3, 32]</sup>:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde K é a constante de forma,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação (em nm),  $\beta$  é a largura a meia altura do pico (em radianos) e  $\theta$  é o ângulo de difração (em radianos).

Na tabela seguinte é apresentado um resumo da aplicabilidade relativa das várias técnicas de caracterização.

**Tabela 2.2 – Resumo das principais técnicas de caracterização das NPs com indicação da informação fornecida. ‘x’ indica que a técnica fornece informações incertas ou incompletas para uma vasta gama de materiais; ‘xx’ indica que a técnica fornece informação intermédia; ‘xxx’ indica que a técnica é amplamente (mas não universal) aplicável e muitas vezes dá informações bastante fiáveis (adaptado de <sup>[35]</sup>).**

	SEM/TEM	DLS	DRX
<b>Tamanho</b>	xxx	xx	xx
<b>Morfologia</b>	xxx	...	...
<b>Identificação de fase</b>	xx	...	xx
<b>Ocupação local</b>	...	...	x
<b>Composição química</b>	xxx	...	...

A técnica de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier) é uma técnica simples e rápida que permite obter informações acerca do tipo de ligações químicas existentes num composto. O espectro de infravermelho mostra a frequência de vibração dos grupos funcionais que estão presentes na amostra em análise <sup>[75]</sup>.

A espectroscopia UV-VIS, de onde se retira muita informação acerca do tamanho e forma das NPs <sup>[76]</sup>, é uma técnica útil para caracterizar a absorção e transmissão de uma variedade de materiais e soluções e a faixa espectral situa-se, aproximadamente, entre 190 a 900 nm. Com esta técnica é possível determinar se há formação de partículas e se estas formam agregados ou não. Além disso, a interação da luz com comprimento de onda da ordem da dimensão da partícula dá origem a ressonância de plasmon, absorção ou dispersão da luz, podendo observar-se esse efeito através de transmitância ou absorvância. Estes são influenciados pelo tamanho, forma, interações interpartículas, densidade de eletrão livre e meio circundante, o que indica que é uma ferramenta eficiente para obter informação da geometria das NPs, e monitorar a sua agregação <sup>[77]</sup>.





### 3. Revestimento das mNPs

As mNPs tendem a agregar e perdem as suas propriedades superparamagnéticas intrínsecas em solução biológica <sup>[8]</sup>. Por si só, as mNPs não são muito estáveis nem solúveis em água. A solubilização das mNPs é essencial para prevenir a sua agregação e oxidação <sup>[1]</sup>.

Na ausência de qualquer revestimento, as mNPs apresentam superfícies hidrofóbicas com uma grande área superficial em relação ao volume. Devido às interações hidrofóbicas entre as partículas, estas vão unir-se e formar grandes aglomerados, resultando no aumento do tamanho da partícula. Estes aglomerados exibem forte atração magnética dipolo-dipolo entre eles. Quando dois grandes aglomerados se aproximam, cada um deles entra no campo magnético do vizinho. Além das forças de atração entre as partículas, cada partícula está no campo magnético vizinho e torna-se mais magnetizada. A adesão de partículas magnéticas remanescentes provoca magnetização mútua, resultando num aumento da agregação.

Uma vez que as partículas são atraídas magneticamente, para além da floculação usual devido às forças de *van der Waals*, a modificação da superfície das partículas é muitas vezes indispensável. Para a efetiva estabilização das NPs de óxido de ferro, é aconselhável revestir as mesmas <sup>[2]</sup>. As moléculas ideais para a estabilização das mNPs devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. Contudo, as moléculas mais comumente utilizadas são os surfactantes, tais como ácido oleico <sup>[3]</sup>, citrato de sódio e triton X-100, entre outros.

Os surfactantes são moléculas com pelo menos duas regiões, uma parte solúvel em solventes polares (parte hidrofílica) e outra insolúvel em solventes polares (parte hidrofóbica). A parte polar designa-se por “cabeça” e a parte não polar designa-se por “cauda” da molécula de surfactante. Dependendo da natureza destas moléculas, os surfactantes podem ser categorizados em não-iónicos, aniónicos, catiónicos e anfotéricos (Zwitteriónicos) <sup>[50]</sup>.

As moléculas de surfactante podem evitar a nucleação das partículas, o seu crescimento e a sua aglomeração <sup>[59]</sup>. Têm natureza anfífila e desempenham um papel importante na interface das mNPs e do solvente <sup>[3]</sup>.

Para serem utilizadas com segurança e nas aplicações biomédicas, as mNPs devem ser revestidas por materiais que satisfaçam os seguintes requisitos: prevenir a opsonização das mNPs, que conduz a uma mais rápida remoção das partículas do sangue pelo RES; evitar a aglomeração das mNPs no meio biológico; atingir a carga de superfície das mNPs desejada; assegurar a biocompatibilidade das mNPs <sup>[32]</sup>.

O revestimento das mNPs protege o núcleo de ferro e também proporciona um caminho para a conjugação de precursores moleculares, o que confere uma componente funcional biocompatível para as partículas. As NPs de magnetite podem ser revestidas com uma camada de superfície, geralmente material orgânico, o que proporciona uma interface entre o núcleo e o ambiente

circundante. Esta camada superficial pode ainda ser usada para dirigir as NPs a um “local-alvo”. A monocamada pode servir dois propósitos. Em primeiro lugar, para agir como uma barreira entre o núcleo de NPs e o ambiente, para proteger e estabilizar o núcleo. Alguns materiais utilizados para o núcleo tais como óxidos de ferro, por si só, não são estáveis, e são prontamente oxidados, alterando as propriedades valiosas das nanopartículas. Em segundo lugar, a natureza química das monocamadas dita a reatividade, solubilidade e interações interfaciais e pode também determinar o manuseamento biológico das NPs. A maior parte dos núcleos inorgânicos não são solúveis em ambientes aquosos, e a monocamada serve para superar este problema, particularmente para aplicações *in vivo*. O núcleo inorgânico, quando utilizado sozinho, não tem um alvo específico. No entanto, se a monocamada é uma molécula precursora ou se está conjugada a uma molécula específica, pode dirigir a partícula a uma área de interesse <sup>[1]</sup>.

Há diversas formas das mNPs alcançarem a solubilidade e estabilidade em água. Alguns desses métodos incluem o revestimento com carboxilatos (como ácido cítrico, citrato de sódio e ácido oleico), com polímeros sintéticos (como PEG, PVA, PEO e triton X-100) e com polissacarídeos naturais (como dextrano e quitosano). O revestimento é algo essencial para o uso *in vivo* das mNPs pois aumenta a biocompatibilidade <sup>[8]</sup>.

Este trabalho experimental focou-se na utilização de 4 surfactantes: ácido oleico, citrato de sódio, triton X-100 e quitosano.

### 3.1. Ácido oleico

O ácido oleico é usado para prevenir a aglomeração das NPs e ajuda a manter a sua forma esférica original <sup>[78]</sup>. É frequentemente utilizado como surfactante para modificar a superfície das mNPs, uma vez que possui maior afinidade com a superfície da magnetite quando comparado com outros surfactantes <sup>[79]</sup>.

O ácido oleico é um ácido gordo que ocorre naturalmente em várias gorduras animais e vegetais e em óleos. É um óleo inodoro e incolor, apesar de apresentar uma coloração amarelada em algumas amostras comerciais. Trata-se de um ácido carboxílico, pois possui um grupo funcional COOH. É um ácido gordo de cadeia longa, possuindo 18 carbonos na sua estrutura. Por apresentar uma dupla ligação entre os carbonos, é muitas vezes chamado de ácido gordo insaturado.

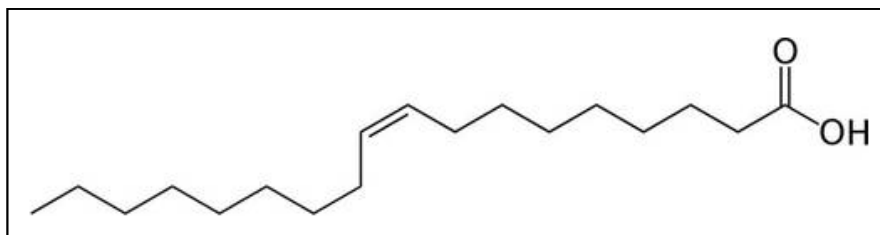


Figura 3.1 – Estrutura do ácido oleico (obtida de <sup>[80]</sup>).

O ácido oleico é um ácido gordo essencial (ómega 9), o qual participa no nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese das hormonas <sup>[79]</sup>.

### 3.2. Citrato de sódio

O citrato de sódio é um surfactante bastante utilizado na síntese de NPs de prata, devido à sua fácil solubilidade em vários solventes <sup>[77]</sup>, e uma vez que estabiliza estas partículas através da repulsão de carga <sup>[81]</sup>, na síntese de NPs de ouro, através de uma reação de redução do ácido cítrico e na síntese de partículas de alumina <sup>[82]</sup>.

O citrato de sódio é um sal do ácido cítrico, que possui um sabor salino.

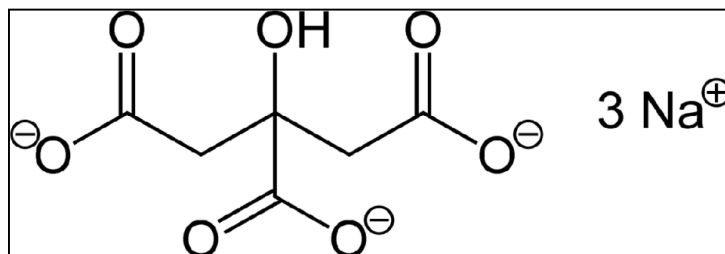


Figura 3.2 – Estrutura do citrato de sódio (obtida de <sup>[83]</sup>).

### 3.3. Triton X-100

O triton X-100 é um surfactante não iónico que possui uma cadeia PEO hidrofílica e um grupo aromático hidrofóbico.

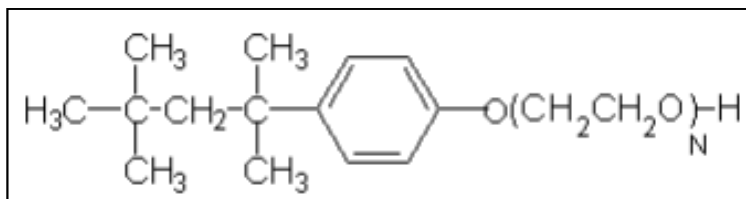


Figura 3.3 – Estrutura do triton X-100 (obtida de <sup>[84]</sup>).

Trata-se de um surfactante compatível com outros surfactantes não-iônicos, aniônicos e catiónicos, sendo amplamente utilizado na produção de detergentes, emulsionantes, agentes solubilizantes e dispersantes <sup>[85]</sup>.

### 3.4. Quitosano

O quitosano é particularmente interessante para a síntese de NPs devido à sua interação com os iões metálicos e com as NP de óxidos de metais. O quitosano é um bom dispersante para uma variedade de nanopartículas, incluindo as mNPs <sup>[86]</sup>. Tem sido considerado um bom biomaterial para aplicações biomédicas, devido às suas importantes propriedades biológicas e químicas <sup>[84]</sup>. O quitosano tem propriedades antibacterianas, antifúngicas, não é tóxico, é biocompatível e biodegradável <sup>[87]</sup>. O revestimento das NPs de magnetite por quitosano deverá aumentar a compatibilidade entre a nanopartícula e o meio aquoso, prevenir a oxidação das partículas, reduzir a toxicidade e agregação e facilitar o transporte <sup>[88]</sup>.

O quitosano é um mucopolissacarídeo natural de origem marinha, com características estruturais semelhantes aos glucosaminoglicanos presentes no exosqueleto dos crustáceos, artrópodes e fungos. Trata-se de um polímero de N-acetil-glucosamina parcialmente desacetilado, obtido através da desacetilação alcalina da quitina, o segundo biopolímero mais abundante a seguir à celulose <sup>[30]</sup>. Desta forma, o quitosano é um nome coletivo que representa uma família de quitinas N-acetiladas, com diferentes graus de desacetilação. No geral, quando o número de unidades de N-acetil-glucosamina é superior a 50%, o biopolímero é denominado quitina. Por outro lado, quando o número de unidades de N-glucosamina é mais elevada, é utilizado o termo quitosano <sup>[89]</sup> (figura 3.4).

O termo quitosano refere-se a um grupo de polímeros com diferentes graus de desacetilação, definidos em termos de percentagem de grupos amina no polímero base e com diferentes pesos moleculares.

O quitosano é carregado positivamente, aderindo, assim, a superfícies carregadas negativamente. Além disso, é solúvel em diversos ácidos e interage com poli-aniões para formar complexos <sup>[30]</sup>.

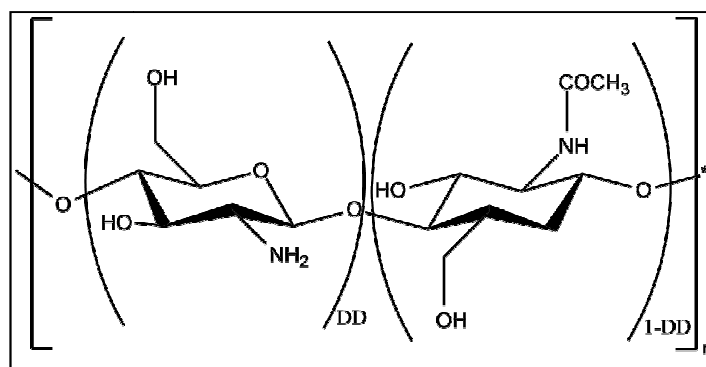


Figura 3.4- Estrutura do quitosano (obtida de <sup>[90]</sup>).



## **4. Procedimento experimental**

Neste capítulo descrevem-se, sumariamente, os materiais e procedimento utilizado, bem como as técnicas de caracterização usadas. Ao longo deste trabalho foi utilizada a técnica da precipitação química para a síntese das mNPs de óxido de ferro.

### **4.1. Síntese das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**

A síntese de mNPs realizou-se segundo o procedimento que se descreve a seguir e utilizando os materiais em baixo indicados. Variaram-se alguns parâmetros inerentes à síntese química como o tempo de agitação, *t*, com o objetivo de verificar a sua influência no tamanho final das partículas.

#### **4.1.1. Materiais**

Cloreto de ferro hexahidratado, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (*Merck*), cloreto de ferro tetra hidratado, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (*Sigma Aldrich*), NH<sub>4</sub>OH aquosa 25% (*Scharlau*) e água *Millipore* (*Milli-Q*).

#### **4.1.2. Procedimento**

As nanopartículas de magnetite foram produzidas adaptando o método já descrito por Gnanaprakash e sua equipa <sup>[91]</sup>. As nanopartículas foram obtidas através da precipitação de sais de ferro em meio alcalino.

As soluções de sais de ferro foram preparadas previamente, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (5 mmol; 1M), FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2.5 mmol; 1M), em meio aquoso. Estas soluções apresentavam uma razão molar de 1:2 (Fe<sup>2+</sup>:Fe<sup>3+</sup>) e foram misturadas, sob constante agitação magnética (1200 rpm). À mistura adicionou-se a amónia aquosa 25%, 10 ml, permanecendo em agitação um certo período de tempo, *t* (*t*= 22, 40, 120, 300, 900, 1800 ou 3600 segundos). O procedimento foi realizado em atmosfera de azoto, a fim de evitar a oxidação das partículas. Após o tempo de agitação, *t*, adicionou-se água *Milli-Q* à solução e, passados alguns minutos, eliminou-se a camada superficial. A solução foi a centrifugar 10 minutos (4000 rpm), a fim de separar as partículas formadas da mistura aquosa. Por fim, procedeu-se às lavagens das NPs, três vezes, com água *Milli-Q*.



## 4.2. Influência de surfactantes

A introdução de surfactantes nas soluções coloidais tem como principal objetivo manter as partículas dispersas e em suspensão, a fim de ser possível funcionalizá-las tendo em vista a aplicação final no tratamento de cancro. Nesse sentido foram testados o **ácido oleico**, o **citrato de sódio** e o **triton X-100** como surfactantes. Variou-se o tempo de agitação, *t*, com o intuito de analisar a sua influência no tamanho final das partículas em suspensão e concluir sobre qual o melhor surfactante e respetiva concentração que permita obter mais nanopartículas em suspensão e durante mais tempo.

### 4.2.1. Materiais

Cloreto de ferro hexahidratado, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (*Merck*), cloreto de ferro tetra hidratado, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (*Sigma Aldrich*), NH<sub>4</sub>OH aquosa 25% (*Scharlau*), ácido oleico (*Fisher Scientific*), citrato de sódio (*Prolab*), triton X-100 (*Seagate technology inc.*) e água *Millipore* (*Milli-Q*).

### 4.2.2. Procedimento

Às nanopartículas sintetizadas de acordo com o procedimento referido em 4.1.2, após 5 minutos de agitação magnética adicionou-se o surfactante (0,064M de ácido oleico- solução 1, ou 0,01M de citrato de sódio- solução 2, ou triton X-100-solução 3) à solução anterior. Após a adição do surfactante, a solução permaneceu em agitação mecânica durante 1 hora. O procedimento foi igualmente realizado em atmosfera de azoto e foi realizada também a etapa de centrifugação e secagem das nanopartículas.

## 4.3. Funcionalização com quitosano

Considerando ainda o objetivo final para a aplicação das nanopartículas magnéticas: tratamento de cancro, tentou-se a funcionalização direta das nanopartículas com quitosano. Para tal, utilizou-se a técnica da gelificação ionotrópica.

### 4.3.1. Materiais

Ácido acético (*Fisher Scientific*), quitosano baixo peso molecular (*Cognis*), tripolifosfato de sódio (*Sigma Aldrich*) e água *Millipore* (*Milli-Q*).

### 4.3.2. Procedimento

Na técnica da gelificação ionotrópica, descrita pela primeira vez por Calvo, em 1997<sup>[92]</sup>, o mecanismo de formação das nanopartículas revestidas com quitosano baseia-se na interação eletrostática entre o grupo amina do quitosano e a carga negativa do poli-anião, como o tripolifosfato (TPP)<sup>[93]</sup>. Essa interação pode ser controlada pela densidade de carga do tripolifosfato e do quitosano, o que está dependente do pH da solução. O TPP é usado na preparação das NPs revestidas de quitosano, uma vez que é não tóxico e multivalente<sup>[87]</sup>. O método da gelificação ionotrópica oferece uma preparação simples das nanopartículas, num meio aquoso. Inicialmente, dissolve-se o quitosano em ácido acético, na presença ou ausência do agente estabilizante (este pode ser adicionado à solução de quitosano antes ou depois da adição do poli-anião). O poli-anião, ou polímeros aniônicos, são posteriormente adicionados e as NPs são formadas espontaneamente, sob agitação mecânica e a temperatura ambiente. O tamanho e carga da superfície das partículas podem ser modificados, alterando a razão entre o quitosano e o estabilizante<sup>[93]</sup>.

Neste trabalho, para a realização da técnica referida anteriormente, retirou-se 5 ml da solução de mNPs previamente preparada (método anterior) e colocou-se numa seringa, juntamente com 15 ml da solução de quitosano (1mg/ml em ácido acético 2%). Num gobelé, à parte, preparou-se uma solução de tripolifosfato de sódio (4 mg/ml). Por fim, fez-se a montagem, como representado na figura 4.1.

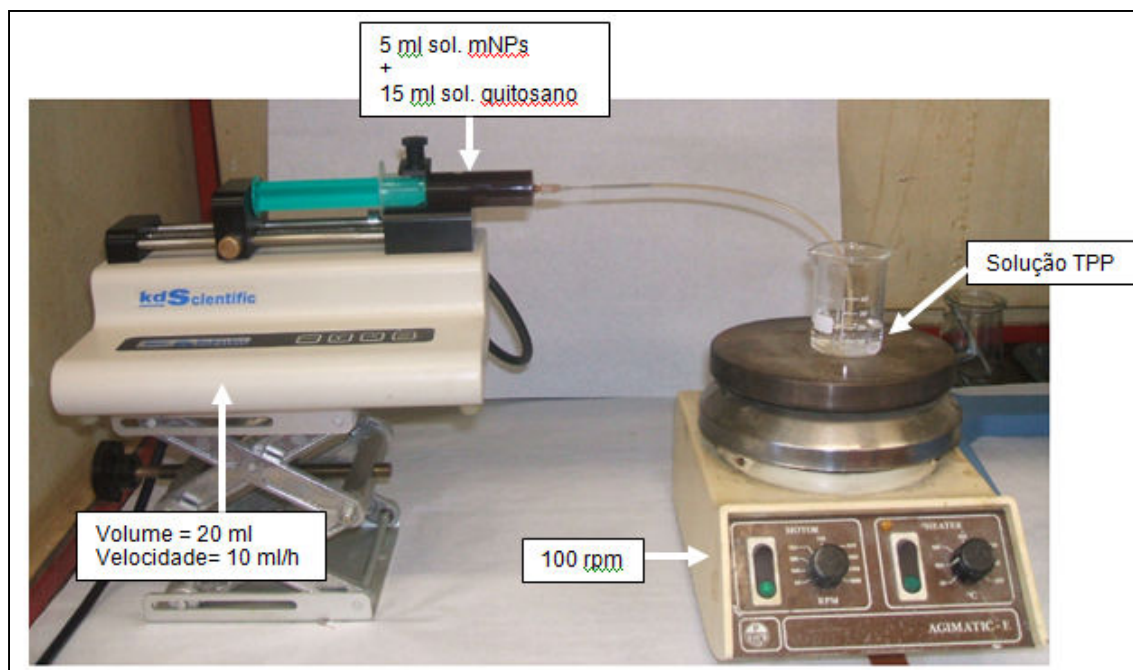


Figura 4.1 – Técnica de montagem da gelificação ionotrópica.

## 4.4. Caracterização das mNPs

### 4.4.1. Absorção UV-VIS

Após a síntese das mNPs, a solução foi ao sonicator durante 1 minuto. A estabilidade da solução foi seguida através de espectroscopia UV-VIS (*PG Instruments modelo T90+*). Os espectros foram feitos após 0, 15, 30 minutos, 1, 2, 6, 8 e 24 horas do tempo de sonicação.

Mediu-se a solução coloidal diluída, uma vez que, devido à sua elevada intensidade, não podia ser medida no espectrofotómetro. Tinha-se uma diluição da solução coloidal com água *Millipore*, na proporção de 1:100 (no caso das nanopartículas de magnetite, e com ácido oleico e citrato de sódio) e de 1:200 (no caso de utilizar triton X-100). Colocou-se a amostra a analisar numa *cuvette* de quartzo, própria para observação em espectroscopia UV-VIS. Fez-se passar o feixe de luz pela *cuvette* com a amostra nos vários tempos acima mencionados. A amostra a medir permaneceu sempre na mesma *cuvette* durante todas as medições, de forma a obter resultados o mais próximo possível do comportamento real da solução coloidal.

#### 4.4.2. Análise da morfologia por SEM

A avaliação da morfologia e tamanho das nanopartículas de magnetite foi obtida por microscopia eletrônica de varrimento de alta resolução (SEM, modelo *Zeiss DSM-962*). Para se observar a amostra no SEM, esta requereu uma preparação cuidadosa. Desta forma, uma pequena gota da amostra foi colocada num suporte próprio, sobre fita de carbono, deixando evaporar todo o solvente da amostra. Posteriormente, o porta-amostras foi inserido na câmara de observação do equipamento, sob vácuo, seguindo-se a observação da amostra.

#### 4.4.3. Diâmetro hidrodinâmico das mNPs (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de magnetite foi medido recorrendo ao aparelho de DLS *AvidNano*. Inicialmente, a amostra foi diluída (1:100) e filtrada com um filtro de seringa de 200 nm. Posteriormente colocou-se uma pequena gota da amostra na *Bladecell*<sup>®</sup> e fez-se a medição.

#### 4.4.4. Difração de raios-X (DRX)

As mNPs foram analisadas recorrendo ao aparelho de difração de raios-x (difractómetro *X'Pert PRO* da *PANalytical*). A amostra, depois de bem seca, foi montada num substrato de Si “0-background”, apesar de nenhum movimento ter sido aplicado, uma vez que a área irradiada não era uniforme. Foi utilizado um tamanho de passo de 0,033° (2 $\theta$ ) numa gama 2 $\theta$  entre 15 e 80°, e uma radiação proveniente de uma ampola de cobre.

#### 4.4.5. Técnica de FTIR

As nanopartículas de magnetite foram analisadas pela técnica de FTIR, com o intuito de identificar as espécies químicas que estavam presentes nas partículas produzidas. Esta técnica foi realizada no espectrofotómetro *FTIR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation*. Inicialmente, prepararam-se as “pastilhas” a observar no aparelho. Fez-se uma mistura das nanopartículas de magnetite bem secas e KBr (2%) e, após essa mistura estar homogénea, colocou-se num molde *SPECAC* de 3 mm de diâmetro que foi a prensar durante 30 minutos. Fez-se o mesmo somente com KBr. Para a visualização do espectro no equipamento, inicialmente foi traçada a linha de base (a “pastilha” só de KBr), colocando no suporte a “pastilha” de KBr. Seguidamente colocou-se a “pastilha” das nanopartículas no suporte que, absorvendo de forma seletiva algumas frequências, apresentou uma variação da transmitância em função do número de onda da radiação que incidiu na amostra. Esta variação, registada na forma de gráfico, correspondeu ao espectro de infravermelho da amostra <sup>[94]</sup>.

#### **4.4.6. Análise da morfologia por TEM**

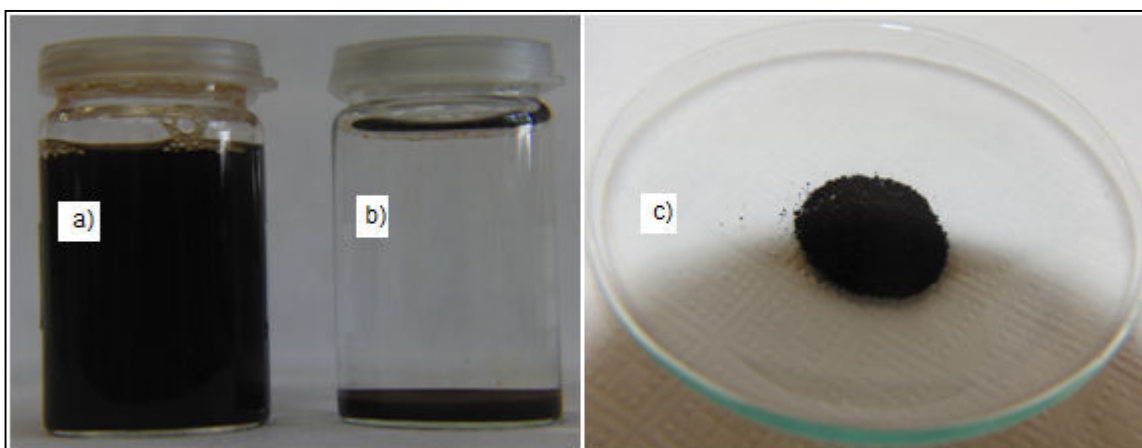
A avaliação da morfologia e tamanho das nanopartículas de magnetite foi obtida através da microscopia eletrónica de transmissão (TEM, *Hitachi H-8100 II*, com emissão termiónica, LaB<sub>6</sub>, e resolução ponto a ponto de 2,7 Å, do Instituto Superior Técnico). Para se observarem as amostras no TEM, estas requereram cuidado na sua preparação. Inicialmente fez-se uma diluição das amostras a analisar (de 1:100, no caso da solução de mNPs com citrato de sódio e revestidas com quitosano, e de 1:200 no caso da solução de mNPs com triton X-100). Depois, uma pequena gota da suspensão foi colocada numa rede própria (rede de carbono), até evaporar todo o solvente. Posteriormente, o porta-amostras, com as duas amostras, foi inserido na câmara de observação do equipamento, seguindo-se a observação das amostras.

## **5. Resultados e discussão de resultados**

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos ao longo deste trabalho.

### **5.1. Síntese de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**

As nanopartículas magnetite sintetizadas sem adição de surfactantes mostraram terem um grau de agregação muito elevado. Decorrido pouco tempo da síntese, verificou-se total sedimentação das nanopartículas, como se pode observar na figura 5.1.



**Figura 5.1 – NPs de magnetite após a sua síntese (a)), após 15 minutos da sua síntese (b)) e após secas (c)).**

Esta conclusão é reforçada pela evolução dos espectros de absorvância da solução de mNPs ao longo do tempo, apresentada na figura 5.2.

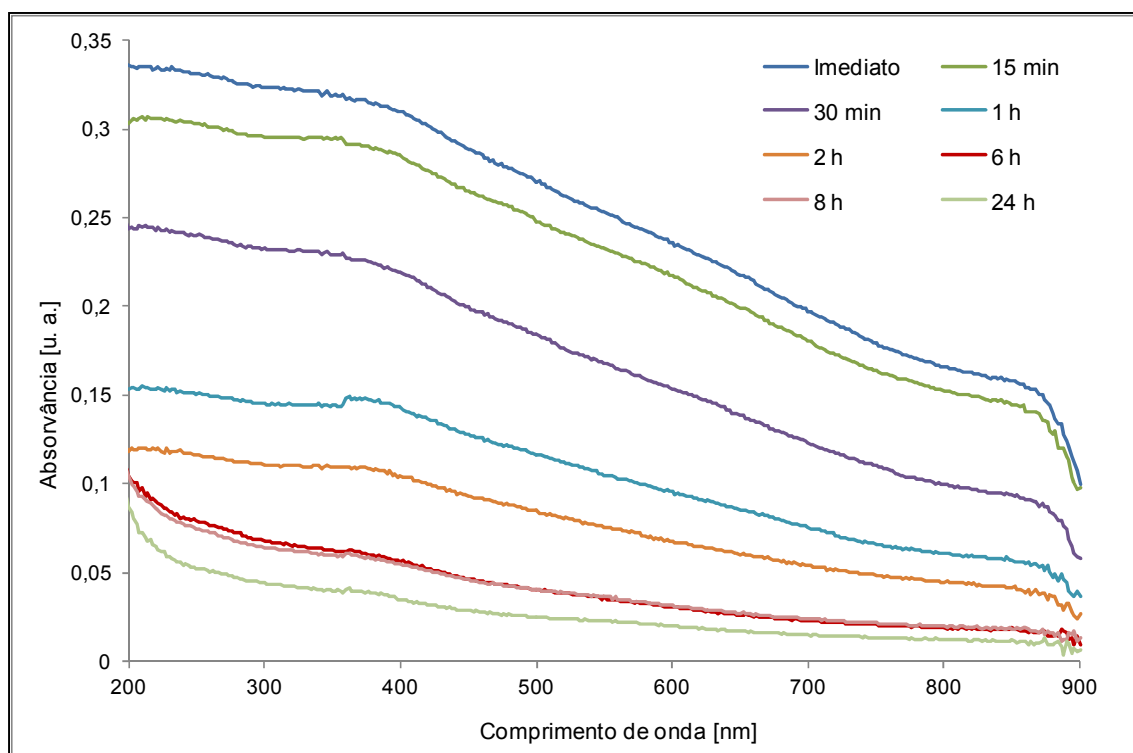
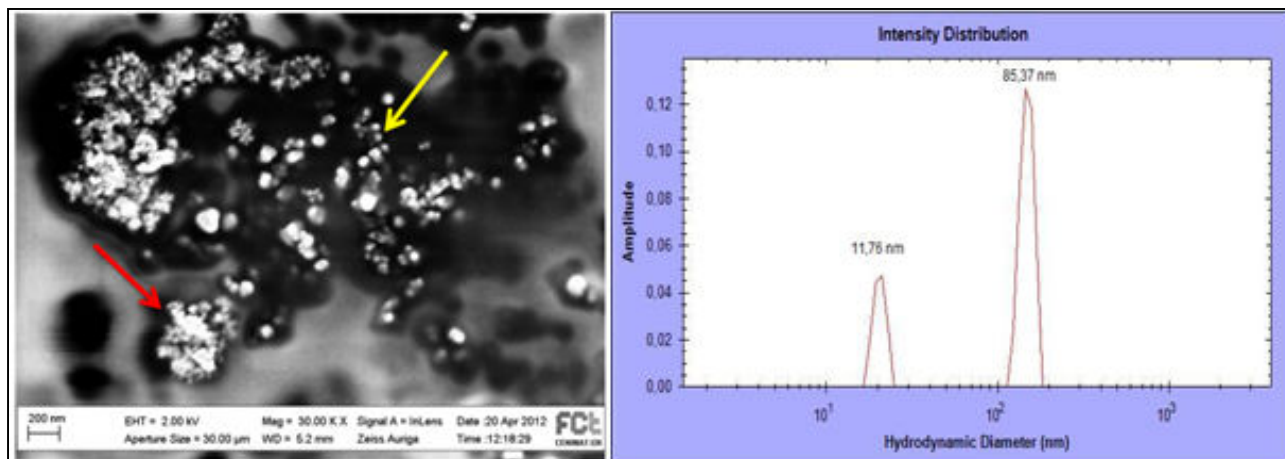


Figura 5.2 – Espectro das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ao longo do tempo.

Como se pode verificar na figura 5.2, as nanopartículas de magnetite não apresentam um pico de absorvância característico. A absorvância da solução coloidal de nanopartículas de magnetite foi medida após sonicação (imediatamente após e passados 15, 30 minutos após, 1, 2, 6, 8 e 24 h). O gráfico evidencia a diminuição da absorvância ao longo do tempo. Esta provavelmente estará relacionada com a sedimentação das nanopartículas no fundo da *cuvette* levando a que a suspensão fique mais transparente. Conclui-se, assim, que as mNPs agregam, sedimentam e não apresentam as características desejadas.

O tempo de agitação não influencia o tamanho das mNPs, neste caso, uma vez que as mNPs sedimentam qualquer que seja o tempo durante o qual a solução está a agitar.

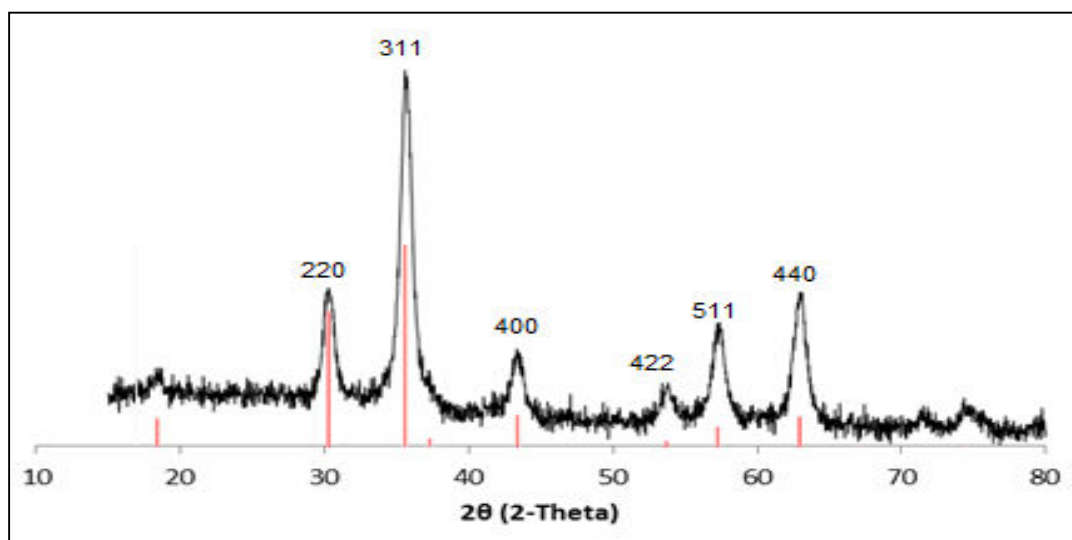
O tamanho e distribuição do tamanho das mNPs obtidas foram avaliados por SEM e DLS.



**Figura 5.3 - Imagem de SEM das mNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e a respetiva distribuição de diâmetros obtida por DLS.**

A figura 5.3. representa uma imagem de SEM das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Estas apresentam forma esférica e alguma aglomeração. Na avaliação em DLS, são visíveis 2 picos bem definidos, um com um diâmetro médio de aproximadamente 12 nm e outro com aproximadamente 85 nm. O pico menos intenso corresponde às partículas que se encontram isoladas das suas vizinhas (assinaladas na imagem com a seta amarela). O pico mais intenso corresponde às partículas que agregaram (assinaladas na imagem com a seta vermelha). Para a análise DLS foi utilizado um filtro de 200 nm, pelo que os agregados maiores, visíveis na imagem SEM, não constam da análise DLS.

Para avaliar a estrutura cristalina das partículas e determinar o tamanho das mesmas, recorreu-se à técnica DRX. Na figura seguinte pode observar-se o difratograma obtido.



**Figura 5.4 – Difratograma de DRX das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .**



A figura 5.4. representa o difratograma de DRX das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Observam-se uma série de picos característicos da magnetite <sup>[88, 91]</sup>, nomeadamente para  $2\theta = 30.2, 35.5, 43.1, 53.4, 57$  e  $62.6$ . Os picos mais estreitos representam a estrutura cristalina da amostra. Estes picos são consistentes com a folha padrão (código de referência: ICSD 98-001-2128), com uma estrutura em espinela inversa.

O tamanho médio da cristalite,  $\tau$ , obtido para o pico mais intenso correspondente ao plano (311), é calculado usando a fórmula de Scherrer:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Onde K é constante de forma (K= 0,94),  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio-X utilizado ( $\lambda = 0,15418$  nm),  $\beta$  é a largura a meia altura do pico ( $\beta = 0,02334$  rad) e  $\theta$  é o ângulo de difração ( $17,79^\circ$ ). O tamanho de cristalite das mNPs obtido através desta fórmula é de aproximadamente 12,74 nm.

Devido à sua elevada área de superfície, as NPs podem apresentar vários defeitos à superfície. Além disso, a elevada tensão interfacial entre as partículas pode causar distorções que provocam uma ampliação da reflexão da difração. Juntando isto ao facto de as nanopartículas poderem ser cristalinas, amorfas ou quasi-cristalinas, pode dizer-se que os cálculos do tamanho das partículas a partir da técnica DRX (através da fórmula de Scherrer) não são muito precisos, justificando a pequena diferença entre o tamanho de cristalite calculado pela fórmula de Scherrer e o tamanho de partícula calculado pelo DLS e TEM <sup>[95]</sup>. Isto significa que o núcleo da nanopartícula se comporta como um único dipolo magnético, apresentando, desta forma, um elevado momento magnético. Desta forma, pode afirmar-se que as nanopartículas de magnetite sintetizadas por este método têm potencial para serem superparamagnéticas. Contudo, para uma correta avaliação acerca do comportamento magnético destas partículas, deveria ser feita a sua caracterização magnética.

Com a adição de um surfactante, por exemplo triton X-100, os picos característicos da magnetite não sofrem alteração (figura 5.5), mantendo, desta forma, a estrutura cristalina das NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

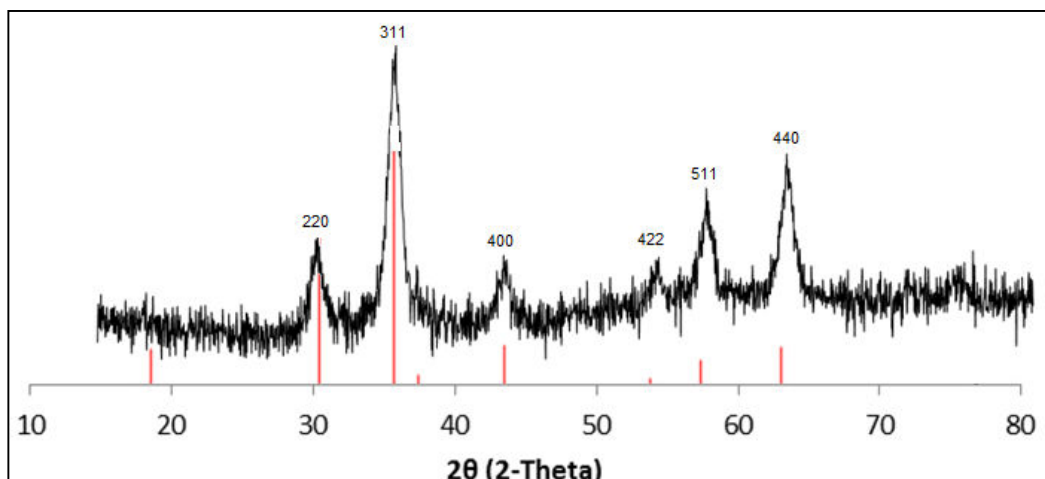


Figura 5.5 Difratoograma das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com triton X-100.

O espectro de FTIR da imagem seguinte é usado para caracterizar os tipos de ligações presentes nas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Observam-se os picos característicos a aproximadamente  $580\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $3400\text{ cm}^{-1}$ . A banda a cerca de  $580\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração da ligação Fe–O, o que confirma a presença de um óxido de ferro <sup>[78, 88]</sup> (pelos dados obtidos em DRX, sabe-se que esse óxido de ferro corresponde à magnetite). Durante a preparação das nanopartículas de magnetite pelo método da precipitação química, as suas superfícies são revestidas por grupos hidroxilo, em ambiente aquoso. Assim, as bandas características dos grupos hidroxilo (–OH), aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $3400\text{ cm}^{-1}$ , aparecem no espectro FTIR <sup>[79]</sup>. Surge também um pico na banda a cerca de  $1068\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à vibração da ligação O–H da molécula da água.

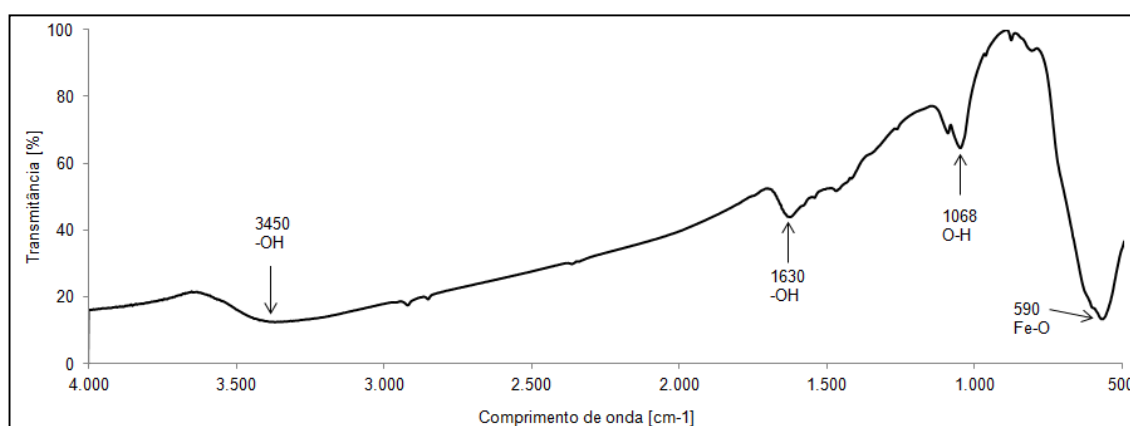


Figura 5.6 – Espectro de FTIR das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

## 5.2. Influência dos surfactantes

Como referido anteriormente os surfactantes estudados, por serem mais biocompatíveis, foram o ácido oleico, o citrato de sódio e o triton X-100. O efeito destes na dispersão das mNPs está indicado a seguir.

### 5.2.1. Ácido oleico

O pH ideal da solução das mNPs deve ser aproximadamente neutro. Para tal, procederam-se a várias lavagens das partículas com etanol, com o objetivo de remover o excesso de amónia. Contudo, com as contínuas lavagens, verificou-se sedimentação das partículas, isto porque, juntamente com o excesso de amónia, também o surfactante foi eliminado da solução (removeu-se, desta forma, o efeito do surfactante, evitar a aglomeração das partículas). Quando as mNPs com ácido oleico são lavadas utilizando muito etanol, pode ocorrer uma dessorção significativa do surfactante. Se houver dessorção demais, pode ocorrer agregação irreversível, devido às forças de atração *van der Waals* entre as partículas <sup>[96]</sup>. Para ir de encontro a este problema, decidiu fazer-se somente 3 lavagens das nanopartículas, corrigindo, posteriormente, o pH com a adição de algumas gotas de HCl diluído.

Para avaliar o tamanho e a distribuição do tamanho das mNPs, observaram-se as mesmas no SEM (microscópio eletrónico de varrimento).

Com a análise das imagens, concluiu-se que o melhor tempo de agitação, *t*, era de 300 segundos (5 minutos), pois formou partículas com dimensões menores. De seguida são apresentadas imagens obtidas no SEM, relativas a este tempo de agitação.

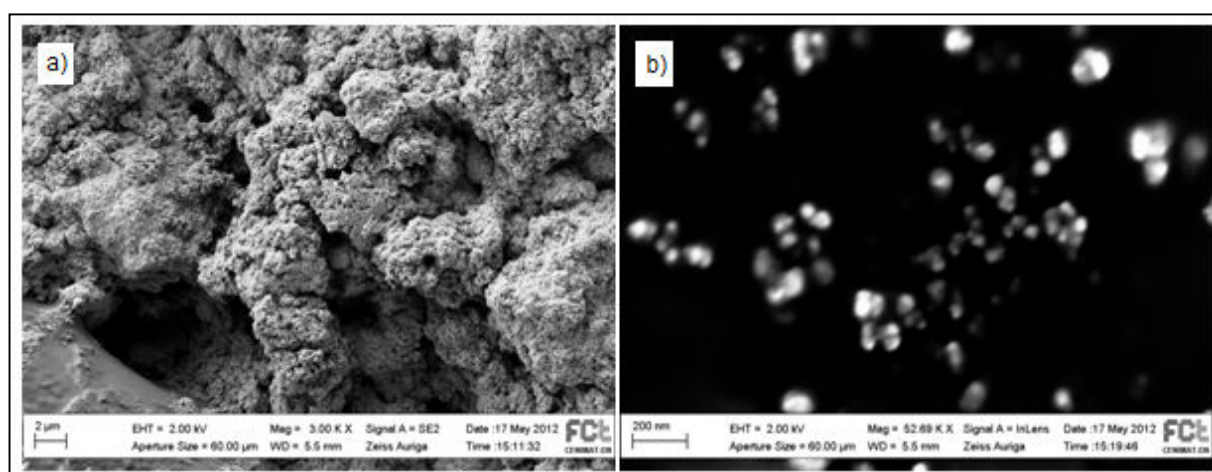


Figura 5.7- Imagem das mNPs obtida no SEM, com ácido oleico e 5 minutos de agitação.

Na figura 5.7 a) é visível a agregação das partículas, porém, mesmo assim conseguem-se observar partículas com tamanho bastante reduzido, figura 5.7 b). Neste caso, as partículas obtidas apresentam tamanho que varia entre 19 e 44 nm, aproximadamente e uma superfície rugosa.

### 5.2.2. Citrato de sódio

Tal como para o ácido oleico, no caso do citrato de sódio procedeu-se somente a 3 lavagens das partículas evitando, desta forma, a eliminação do surfactante em questão. No final, corrigiu-se o pH adicionando algumas gotas de HCl diluído.

As imagens da morfologia das mNPs obtida por SEM estão representadas na figura 5.8. Das imagens de SEM, concluiu-se que o melhor tempo de agitação, *t*, era de 300 segundos (5 minutos), pois formou partículas com dimensões menores.

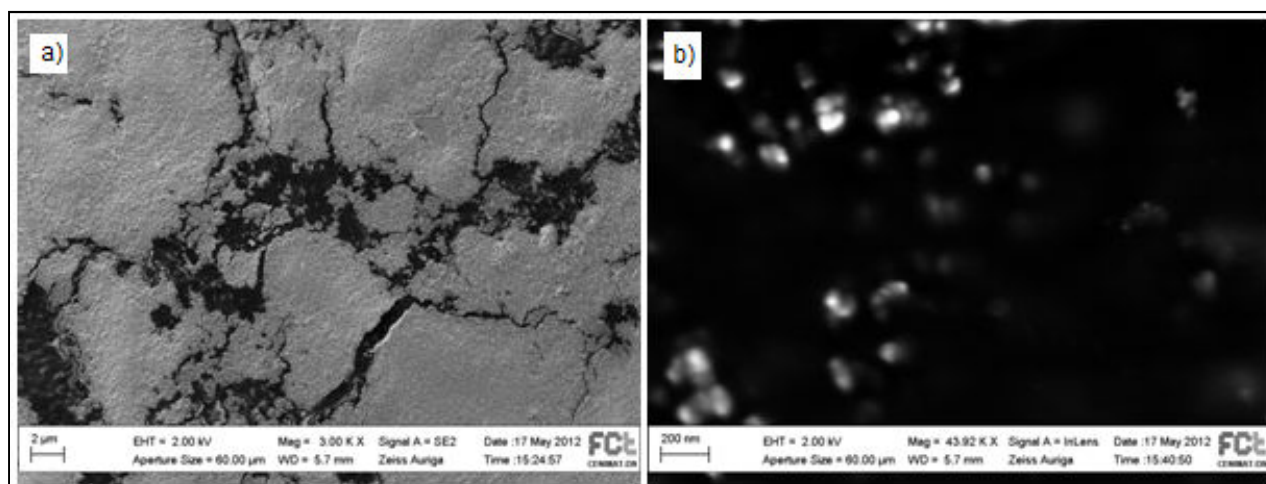


Figura 5.8 – Imagem das mNPs obtida no SEM, com citrato de sódio e 5 minutos de agitação.

Na figura anterior observa-se bastante agregação das partículas (figura 5.8.a)) porém estas apresentam tamanhos semelhantes ao observado para o caso do ácido oleico, entre 19 e 44 nm, aproximadamente, figura 5.8 b).

Tanto para o ácido oleico como para o citrato de sódio, concluiu-se que o tempo de agitação que dá origem a mNPs mais pequenas era de 300 segundos (5 minutos), este é também referenciado na literatura <sup>[91]</sup>. Com os restantes tempos de agitação, obtiveram-se mNPs com dimensões superiores.

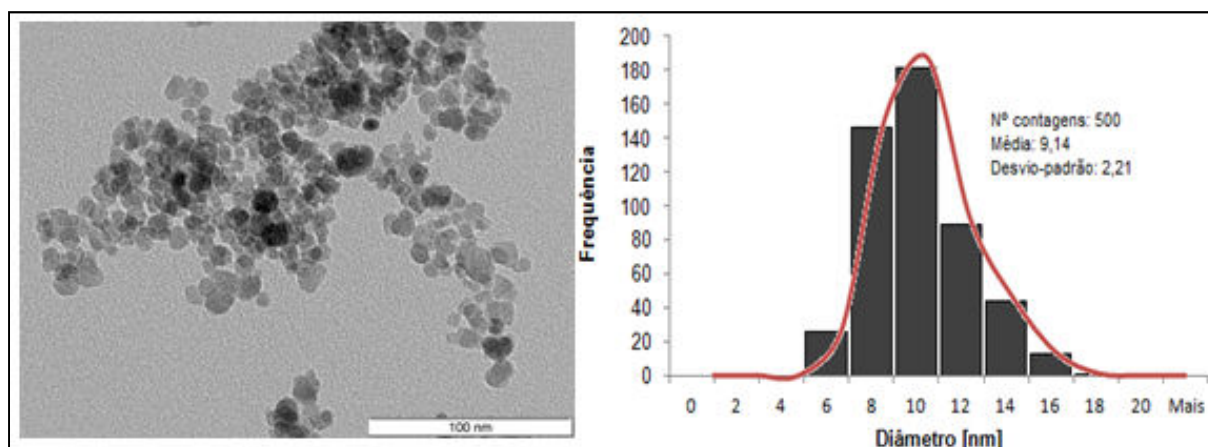
Contudo, concluiu-se que, tal como é evidente nas imagens anteriores, ambos os surfactantes nas concentrações usadas não impediram a agregação das partículas. Assim, resolveu-se estudar a

influência da concentração do surfactante na dispersão das mNPs. Nesse estudo incluiu-se, também, o triton X-100.

### 5.3. Influência da concentração dos surfactantes

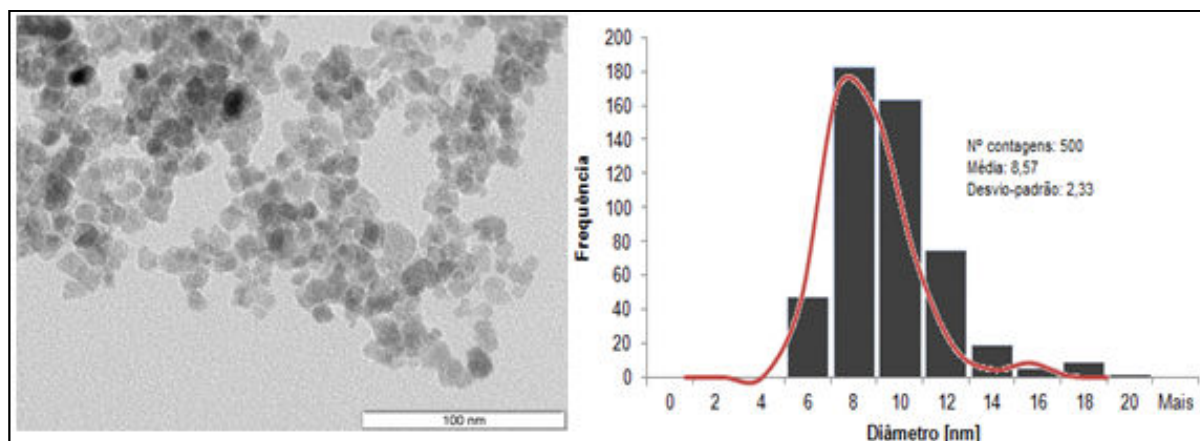
Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração do surfactante, introduziram-se diferentes concentrações de ácido oleico, citrato de sódio ou triton X-100 nas soluções aquosas de mNPs, e analisou-se a variação provocada no espectro de absorvância de forma a encontrar a melhor concentração de cada surfactante, aquela que mantém a solução coloidal estável por mais tempo.

Após a síntese das mNPs com os surfactantes, recorreu-se ao TEM para avaliar o tamanho e distribuição do tamanho das partículas. Os resultados encontram-se representados nas figuras seguintes.



**Figura 5.9 – Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanho das mNPs com citrato de sódio (0,00125M).**

A figura 5.9. representa uma imagem de TEM das partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sintetizadas com citrato de sódio. A maior parte das nanopartículas encontra-se separada das suas vizinhas devido ao surfactante existente à superfície das mesmas. As mNPs apresentam forma esférica, com diâmetros médios entre 6 e 16 nm (a distribuição de tamanho é determinada medindo vários diâmetros no software *ImageJ*). Apesar de exibirem boa dispersão, as partículas apresentam alguma aglomeração devido à elevada área de superfície e às interações magnéticas dipolo-dipolo entre partículas.



**Figura 5.10 - Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanho das mNPs com triton X-100 (0,026M).**

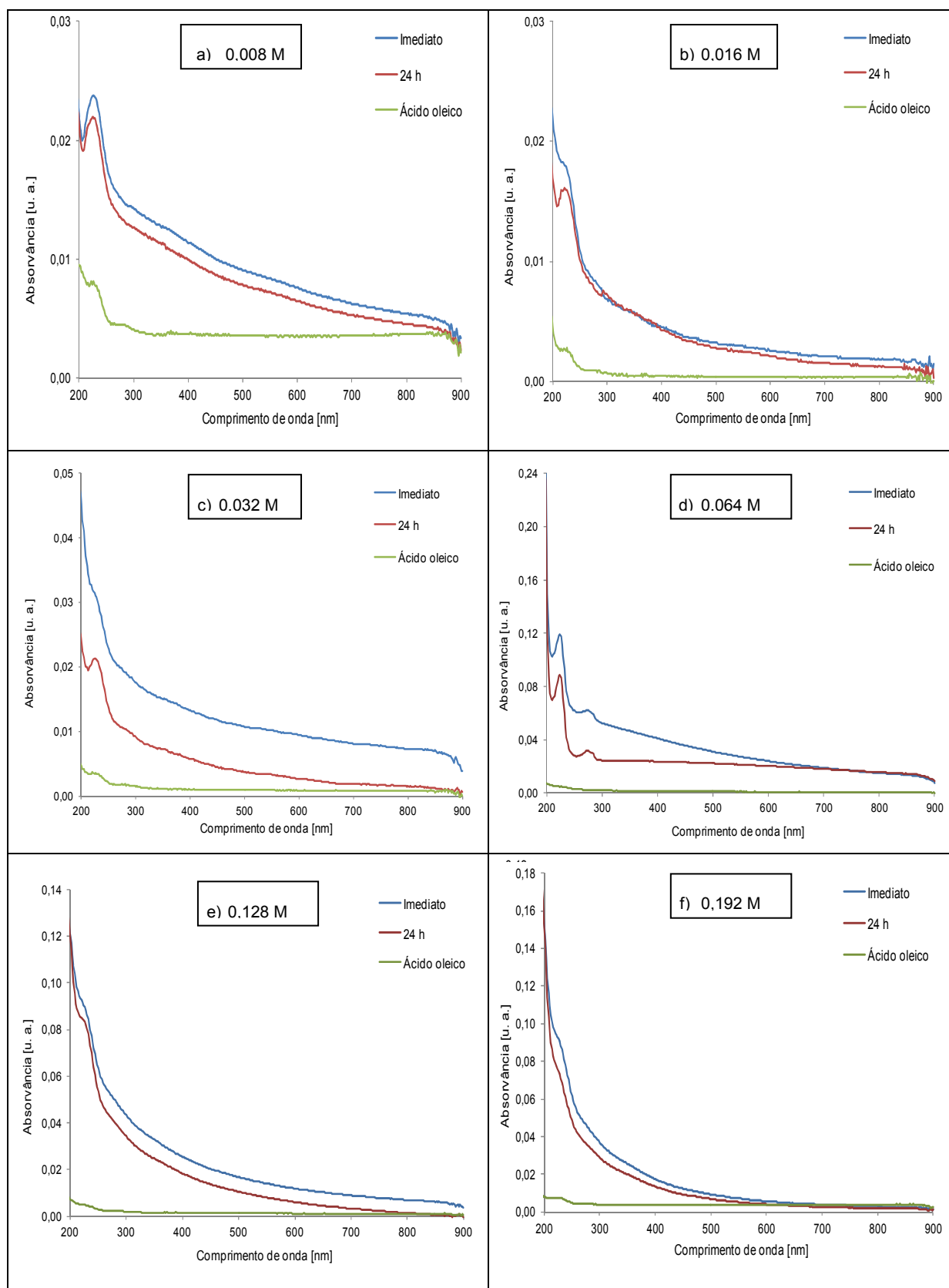
A figura 5.10. representa uma imagem de TEM das partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sintetizadas com triton X-100. A maior parte das nanopartículas encontram-se separadas das suas vizinhas devido ao surfactante existente à superfície das mesmas. Após a modificação de superfície das mNPs com triton X-100, estas apresentam forma esférica, com diâmetros entre 6 e 20 nm (a distribuição de tamanho é determinada medindo vários diâmetros no software *ImageJ*). Apesar de exibirem boa dispersão, as partículas apresentam alguma aglomeração devido à elevada área de superfície e às interações magnéticas dipolo-dipolo entre partículas.

### 5.3.1. Ácido oleico

Existem vários fatores que influenciam a estabilidade de uma solução coloidal: irradiação com radiação eletromagnética, flutuações de temperatura, etc. A estabilidade de uma solução coloidal resulta de uma barreira de potencial que se desenvolve como resultado de uma competição entre as forças de atração *van der Waals* e as forças de repulsão de *Coulomb*. Em solução, as nanopartículas podem ser estabilizadas selecionando as condições ótimas de formação da solução, o que impede a agregação das partículas<sup>[97]</sup>.

Neste trabalho investigou-se a estabilidade das soluções, com vários surfactantes e diversas concentrações dos mesmos, ao longo do tempo.

A influência da concentração de ácido oleico na dispersão e estabilização das soluções de mNPs está representada nos gráficos da figura 5.11.



**Figura 5.11 - Medições efetuadas imediatamente e 24h após a síntese de mNPs com ácido oleico em várias concentrações: a) 0,008M; b) 0,016M; c) 0,032M; d) 0,064M; e) 0,128M; f) 0,192M.**

A figura 5.11 representa os espectros de UV-VIS para as amostras com ácido oleico em diferentes concentrações comparando o espectro imediato com 24h após a sonicação. Além disso, em cada espectro está também representado o pico correspondente ao ácido oleico (na mesma concentração utilizada).

Considerando que, quanto maior a intensidade do pico (aumento da absorvância), maior a quantidade de partículas em suspensão <sup>[98]</sup>, pode considerar-se que a concentração  $C = 0,064M$  é a mais adequada, dentro do intervalo testado. Isto porque, nos 220 nm é onde o pico é mais intenso. Verifica-se ainda a presença de uma bossa nos 280 nm, o que poderá estar relacionado com as partículas de maior dimensão, ou seja, os agregados.

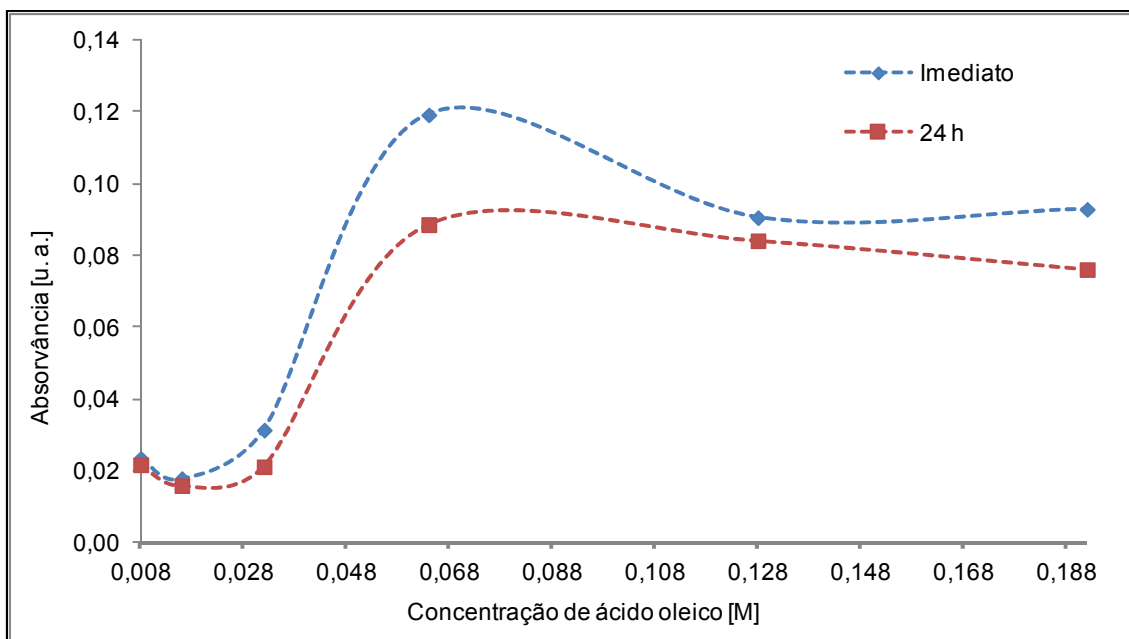
Com o aumento da concentração de ácido oleico, os picos mais intensos tornam-se mais definidos, devido à saturação do meio. O oposto se verifica quando a concentração de surfactante é demasiado elevada, o que torna os picos menos definidos. Ou seja, dentro do intervalo testado parece existir uma concentração ótima de ácido oleico de forma a promover a estabilidade das nanopartículas.

Por último, verifica-se que após as 24h ocorre sedimentação em todos os casos, pois a intensidade do pico diminui. No entanto, a posição do pico mantém-se estável, o que leva a concluir que não há formação de novos agregados de partículas <sup>[98]</sup>, apenas sedimentação dos agregados de partículas já formados. Desta forma podemos supor que os agregados se formaram antes da adição do surfactante.

Como já foi referido, as NPs de magnetite não apresentam um pico característico. O pico que se verifica para comprimentos de onda inferiores corresponde ao pico característico do respetivo surfactante. Existe uma diferença significativa nas intensidades dos picos do espectro do surfactante e do espectro das NPs com surfactante, o que pode ser explicado pela presença de nanopartículas em suspensão, que contribuem para um aumento da intensidade do pico.

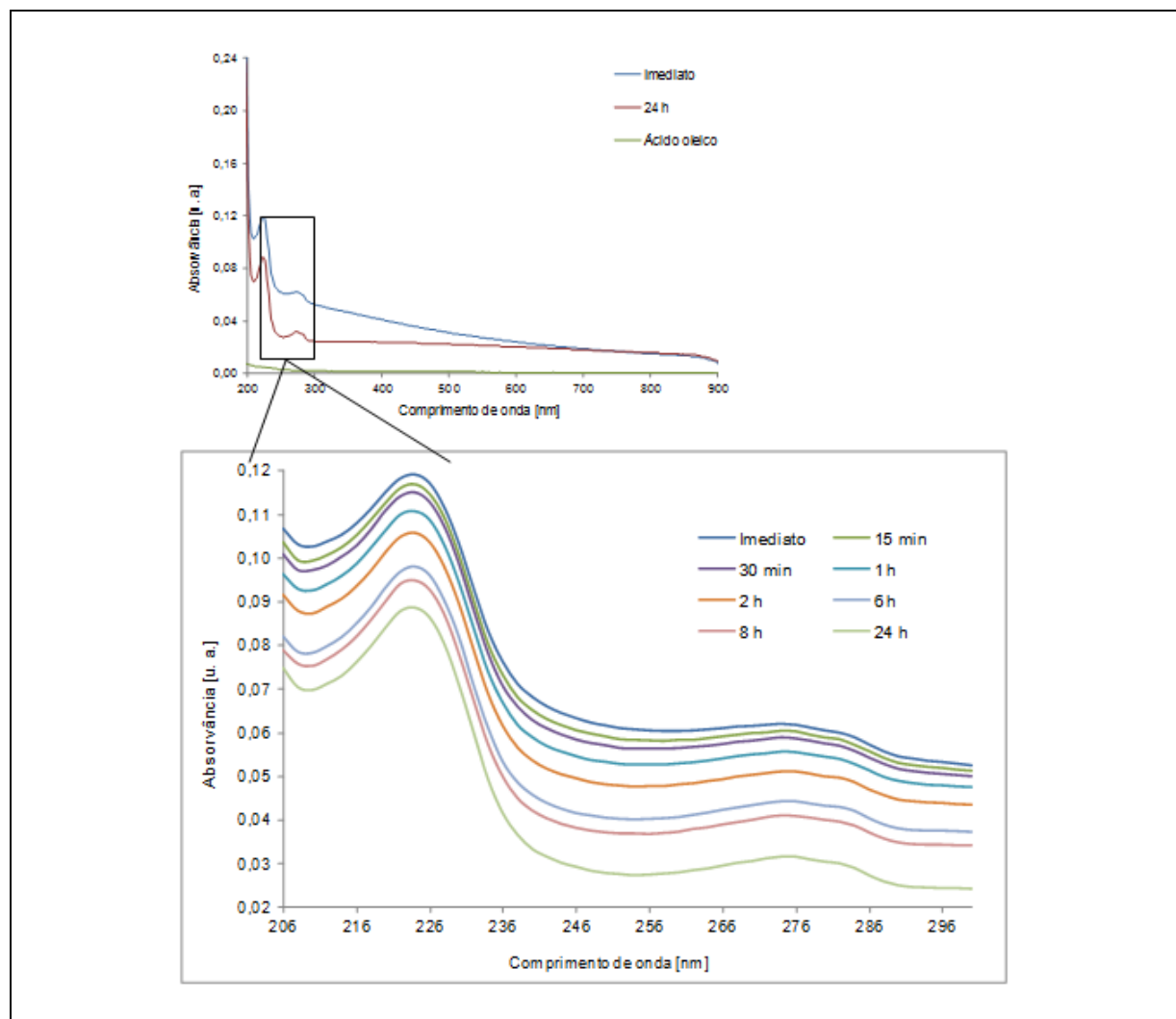
Na figura 5.12 apresenta-se a variação da intensidade do pico em função da concentração de ácido oleico. A baixas concentrações de surfactante, as NPs de magnetite sedimentam. Na concentração  $C=0,064M$  atinge-se um patamar ideal, no qual a quantidade de partículas em suspensão é máxima. Após esse patamar, a quantidade de NPs em suspensão decresce um pouco, tornando-se praticamente estável. Confirma-se, assim, que a concentração  $C=0,064M$  é a melhor concentração de ácido oleico, dentro das concentrações testadas.





**Figura 5.12 – Comparação do valor da absorvância nas diferentes concentrações de ácido oleico, no pico de maior intensidade (224 nm).**

Na figura 5.13 encontra-se representado o comportamento da solução de  $C=0,064M$ , ao longo do tempo, com evidência no pico de maior intensidade. Pode observar-se que, ao longo do tempo, existe sedimentação das nanopartículas, apesar de, mesmo assim, ser a concentração que mantém mais partículas em suspensão (mesmo após 24 horas). As suspensões de nanopartículas são estáveis por mais tempo quando existem cargas positivas na superfície das NPs que anulam as cargas negativas da superfície do surfactante, provocando estabilização da solução coloidal, uma vez que previne as partículas da agregação devido à forte repulsão colômbica <sup>[77]</sup>. Uma vez que, neste caso, não se obtém uma estabilização total da solução, pode concluir-se que, na superfície das mNPs se encontrem também cargas negativas. No entanto, para uma melhor conclusão acerca da carga de superfície das nanopartículas de magnetite, deveria ser medido o seu potencial zeta. A sedimentação ao longo do tempo também pode ser justificada pelas forças de *van der Waals*, que se tornam dominantes, o que resulta na formação de aglomerados <sup>[77]</sup>.



**Figura 5.13 – Comportamento da solução de ácido oleico  $C=0,064M$  ao longo do tempo, no pico de maior intensidade.**

As imagens anteriores dizem respeito a um estudo de estabilidade a curto prazo, um estudo de estabilidade para 24 horas, no máximo. A imagem seguinte representa um estudo de estabilidade a longo prazo, feito para um período máximo de 8 semanas.

Na figura 5.14 encontra-se representada a percentagem de massa de NPs com ácido oleico que se mantém em suspensão ao longo de 8 semanas.

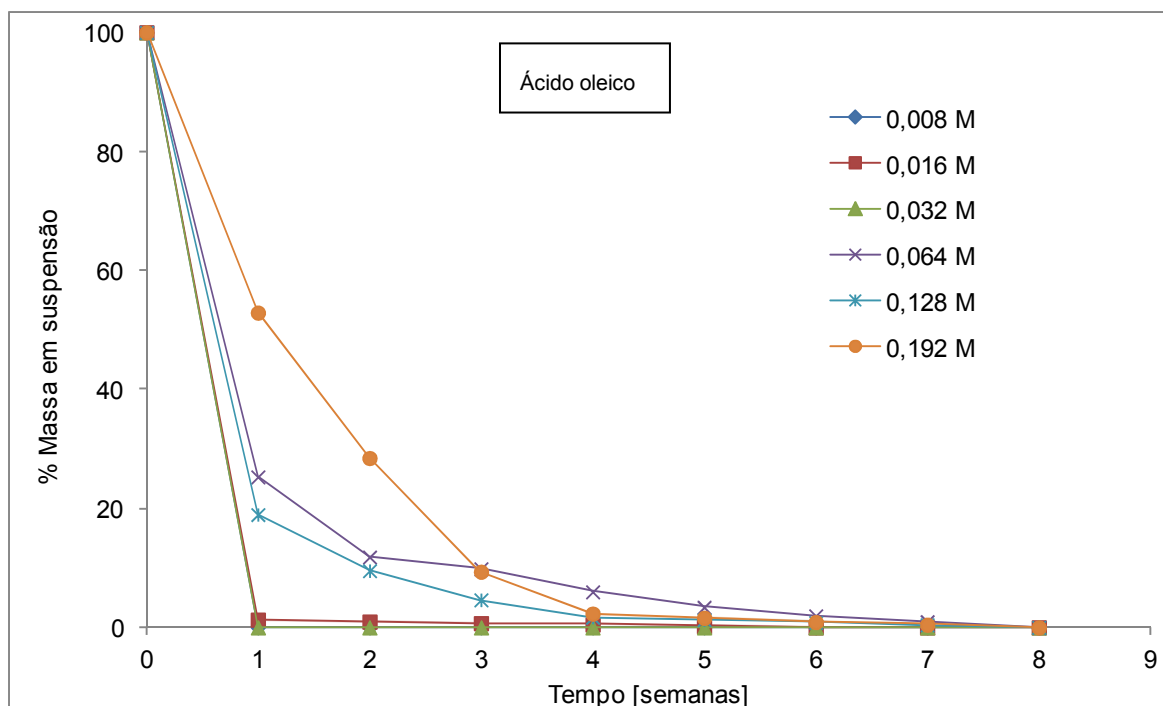


Figura 5.14 - Percentagem de massa em suspensão, ao longo do tempo, das mNPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com diferentes concentrações de ácido oleico (pontos correspondem a um valor médio, com n=3).

Tabela 5.1 - Valor médio de cada ponto e respetivo desvio-padrão (em %).

Concentração de ácido oleico [M]	Tempo [semanas]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>0,008</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,016</b>	1,28 ± 0,66	0,96 ± 0,37	0,71 ± 0,36	0,51 ± 0,46	0,21 ± 0,37	0,00	0,00	0,00
<b>0,032</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,064</b>	25,29 ± 16,45	11,82 ± 5,24	9,84 ± 4,65	5,98 ± 1,58	3,38 ± 0,90	1,95 ± 0,40	0,95 ± 0,23	0,00
<b>0,128</b>	18,97 ± 1,60	9,54 ± 0,74	4,62 ± 1,00	1,70 ± 0,83	1,18 ± 0,13	0,81 ± 0,14	0,45 ± 0,18	0,00
<b>0,192</b>	52,91 ± 10,12	28,47 ± 5,54	9,36 ± 1,61	2,32 ± 0,74	1,62 ± 0,72	0,90 ± 0,68	0,46 ± 0,13	0,00

A concentração de 0,064M mantém-se em suspensão durante mais tempo (até 6 semanas sem sedimentar), o que está de acordo com os resultados obtidos com a espectroscopia UV-VIS. As mNPs com concentrações mais baixas de ácido oleico são as que sedimentam mais rapidamente

(a quantidade de surfactante pode não ser suficiente, não revestindo as partículas, o que leva a uma agregação das mesmas e posterior sedimentação).

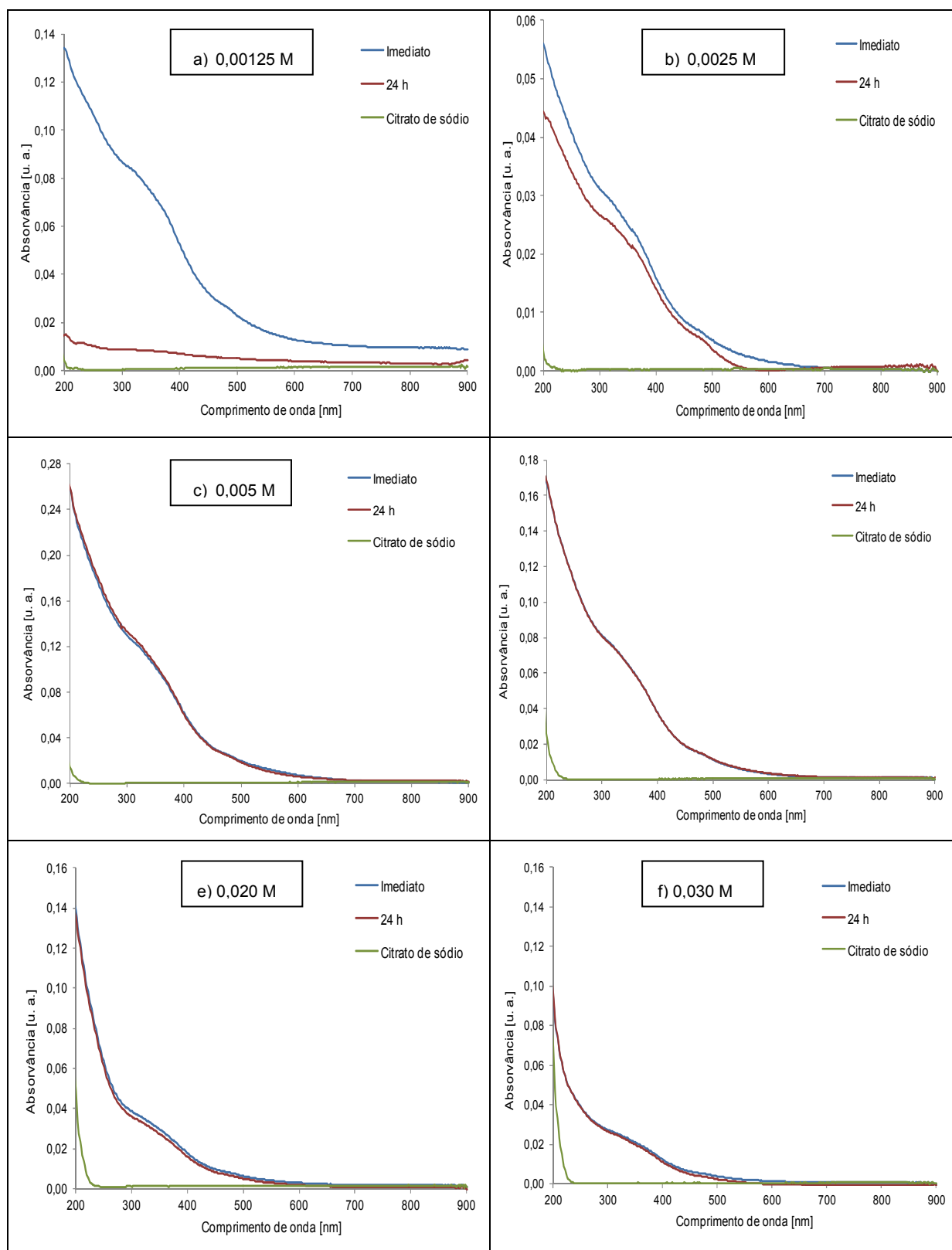
### 5.3.2. Citrato de sódio

A figura 5.15 representa os espectros de UV-VIS para as amostras com citrato de sódio em diferentes concentrações comparando o espectro imediato com 24h após a sonicação. Além disso, em cada espectro está também representado o pico correspondente ao citrato de sódio (na mesma concentração).

Tal como no caso anterior, considera-se que, quanto maior a intensidade do pico (aumento da absorvância), maior a quantidade de partículas em suspensão <sup>[98]</sup>. Sendo assim, pode considerar-se que a concentração  $C = 0,005M$  é a mais adequada, dentro do intervalo testado. Entre os 290 e 390 nm verifica-se a presença de uma bossa, o que poderá estar relacionado com a existência de partículas mais agregadas.

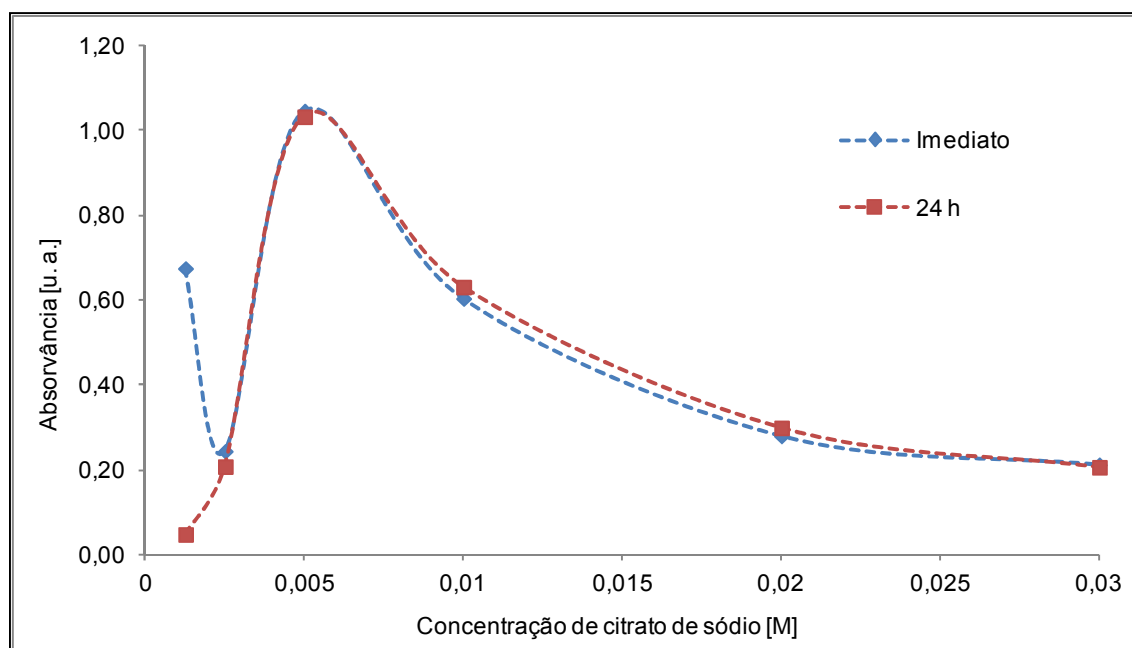
Analisando os gráficos da figura 5.15, verifica-se que após as 24h ocorre sedimentação em todos os casos (apesar de não ocorrer tanta sedimentação como com o surfactante anterior), pois a intensidade do pico diminui. No entanto, a posição do pico mantém-se estável, o que leva a concluir que não há formação de novas partículas <sup>[98]</sup>, apenas alguma sedimentação das partículas já formadas.

Como já foi referido, as NPs de magnetite não apresentam um pico característico. O pico que se verifica para comprimentos de onda inferiores corresponde ao pico característico do citrato de sódio. A diferença da intensidade entre o espectro do surfactante e do espectro das partículas com surfactante pode ser justificada pela presença de nanopartículas em suspensão, que contribuem para um aumento da intensidade do pico.



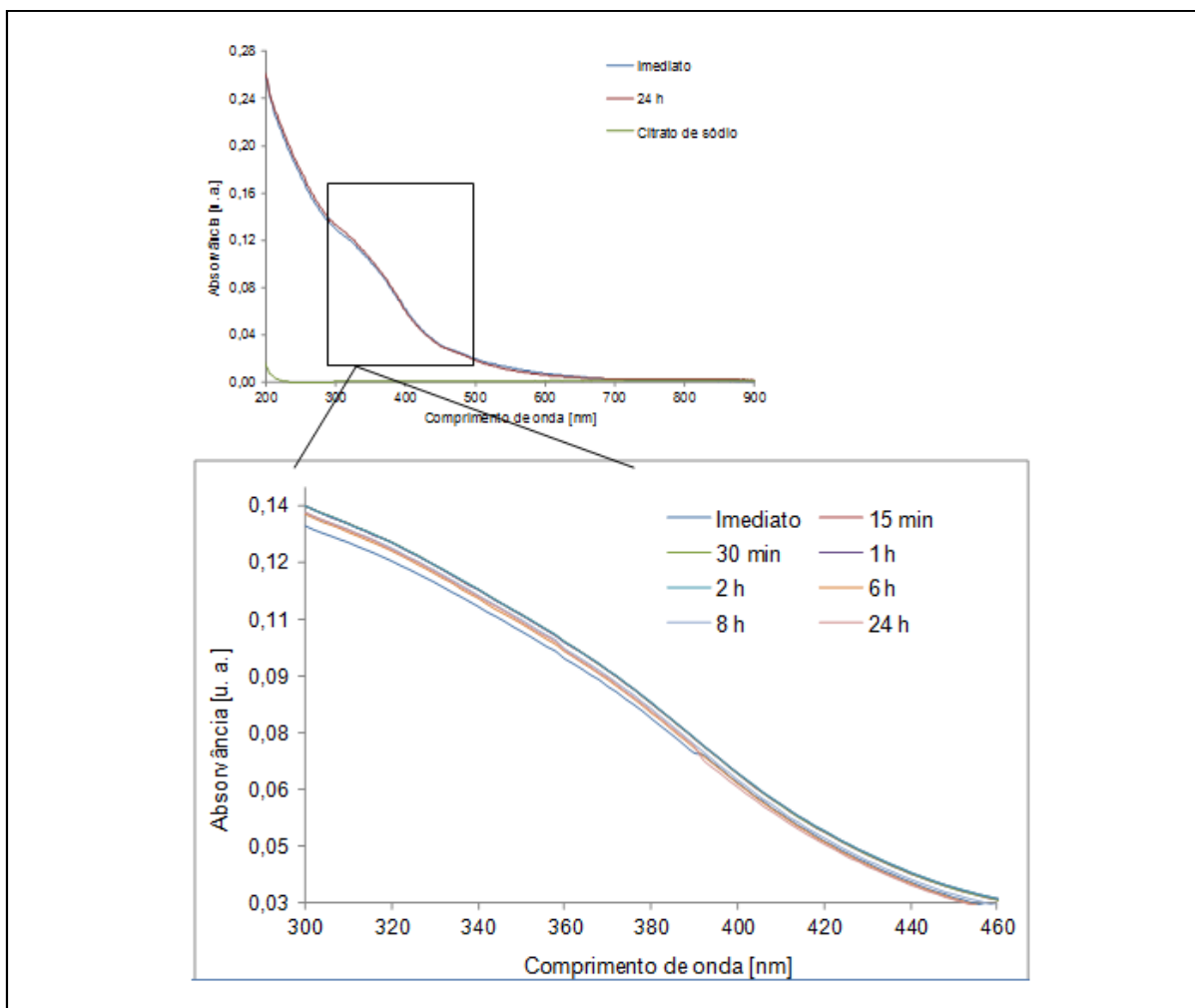
**Figura 5.15 - Medições efetuadas imediatamente e 24h após a síntese de mNPs com citrato de sódio em várias concentrações: a) 0,00125M; b) 0,0025M; c) 0,005M; d) 0,01M; e) 0,02M; f) 0,03M.**

Na figura 5.16 apresenta-se a variação da intensidade do pico em função da concentração de citrato de sódio. Na concentração mais baixa de surfactante, as NPs de magnetite sedimentam (existe uma grande diferença de intensidades passadas 24 horas). Na concentração  $C=0,005M$  atinge-se um patamar ideal, no qual a quantidade de partículas em suspensão é máxima. Após esse patamar, a quantidade de NPs em suspensão diminui significativamente, o que leva a confirmar que a concentração  $C=0,005M$  é a melhor concentração de citrato de sódio, dentro das concentrações testadas.



**Figura 5.16 – Comparação do valor da absorvância nas diferentes concentrações de citrato de sódio no pico de maior intensidade (300 nm).**

Na figura seguinte encontra-se representado o comportamento da solução de  $C=0,005M$ , ao longo do tempo, com evidência no pico de maior intensidade. Pode observar-se que, ao longo do tempo, a sedimentação das NPs é bastante inferior à sedimentação verificada nas soluções de nanopartículas com ácido oleico. Como já foi referido, as suspensões de nanopartículas são estáveis por mais tempo quando existem cargas positivas na superfície das NPs que anulam as cargas negativas da superfície do surfactante, provocando estabilização da solução coloidal, uma vez que previne as partículas da agregação devido à forte repulsão colômbica <sup>[77]</sup>. A agregação é, desta forma, evitada, conseguindo uma estabilização quase total da solução.



**Figura 5.17 – Comportamento da solução de citrato de sódio  $C=0,005M$  ao longo do tempo, no pico de maior intensidade.**

As imagens anteriores dizem respeito a um estudo de estabilidade a curto prazo, um estudo de estabilidade para 24 horas, no máximo. A imagem seguinte representa um estudo de estabilidade a longo prazo, feito para um período máximo de 8 semanas.

Na figura 5.18 encontra-se representada a percentagem de massa de NPs com citrato de sódio que se mantém em suspensão, ao longo de 8 semanas.

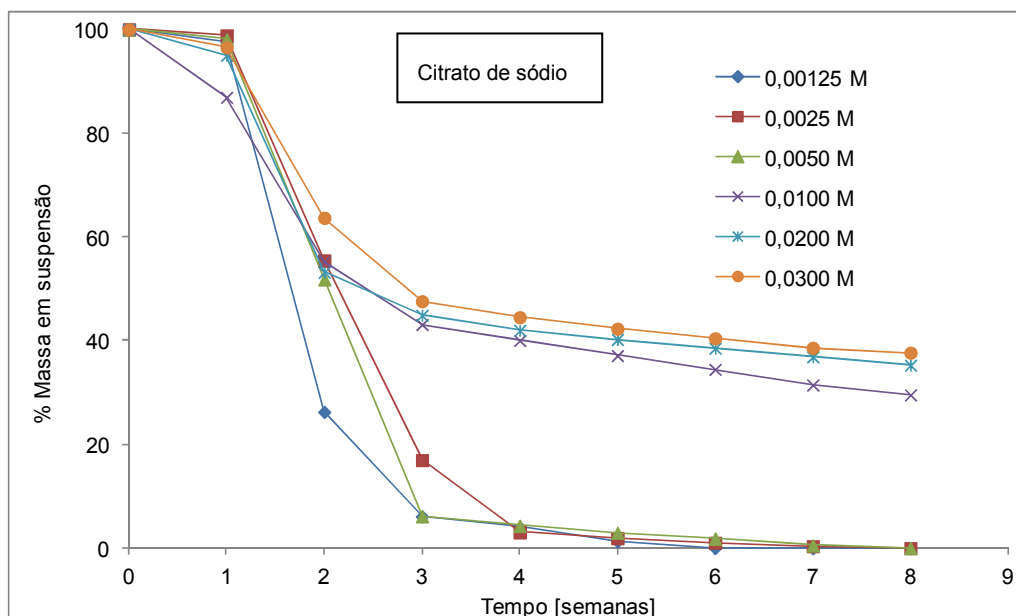


Figura 5.18 - Percentagem de massa em suspensão, ao longo do tempo, das mNPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com várias concentrações de citrato de sódio (pontos correspondem a um valor médio, com n=3).

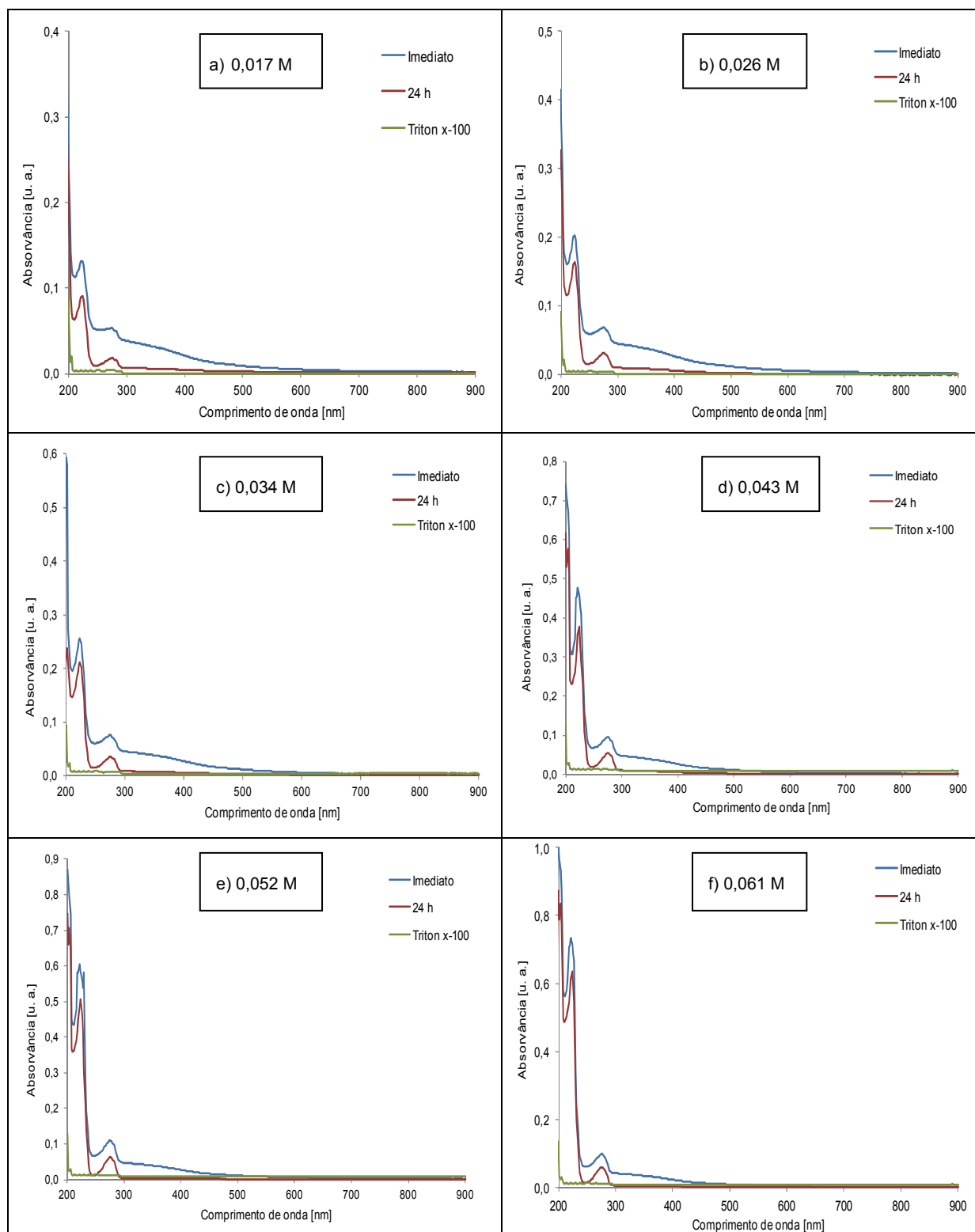
Tabela 5.2 - Valor médio de cada ponto e respetivo desvio-padrão (em %).

Concentração de citrato de sódio [M]	Tempo [semanas]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>0,00125</b>	97,53 ± 2,51	26,28 ± 13,08	6,11 ± 6,11	3,99 ± 3,95	1,34 ± 0,61	0,05 ± 0,08	0,00	0,00
<b>0,0025</b>	98,12 ± 0,85	55,45 ± 14,28	16,98 ± 11,42	3,06 ± 0,88	1,93 ± 0,57	1,05 ± 0,32	0,38 ± 0,19	0,00
<b>0,0050</b>	98,85 ± 0,53	51,83 ± 24,60	6,15 ± 7,89	4,31 ± 5,46	2,96 ± 3,77	1,84 ± 2,43	0,52 ± 0,70	0,00
<b>0,0100</b>	86,90 ± 14,05	55,26 ± 27,32	43,11 ± 13,98	40,03 ± 13,82	37,13 ± 12,36	34,47 ± 11,93	31,47 ± 10,33	29,55 ± 10,32
<b>0,0200</b>	95,03 ± 4,87	53,19 ± 5,75	44,88 ± 3,66	41,99 ± 0,84	40,24 ± 0,78	38,55 ± 0,95	36,88 ± 1,27	35,27 ± 2,35
<b>0,0300</b>	96,56 ± 2,42	63,69 ± 12,86	47,62 ± 7,04	44,53 ± 6,04	42,30 ± 5,77	40,46 ± 5,52	38,62 ± 5,78	37,68 ± 5,67

A concentração de 0,030M mantém-se em suspensão durante mais tempo (até 8 semanas sem sedimentar). A concentração de 0,0050M (melhor concentração de surfactante obtida pela espectroscopia UV-VIS) sedimenta totalmente passadas 7 semanas. Conclui-se que esta concentração é a melhor para uma estabilização da solução a curto prazo (após uma semana ainda mantém cerca de 99% das partículas em suspensão), não sendo, porém, a melhor para uma estabilização para um período de tempo muito longo. Para uma estabilização deste tipo, a concentração de 0,030M é a melhor.



### 5.3.3. Triton X-100



**Figura 5.19 - Medições efetuadas imediatamente e 24h após a síntese de mNPs com triton X-100 em várias concentrações: a) 0,017M, b) 0,026M, c) 0,034M, d) 0,043M, e) 0,052M, f) 0,061M.**

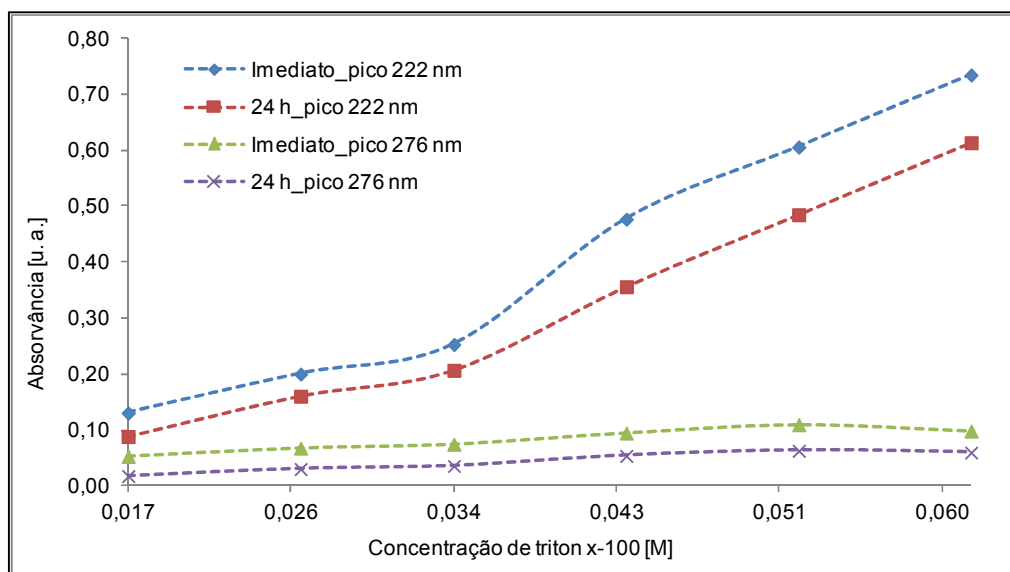
A figura anterior representa os espectros de UV-VIS para as amostras com triton X-100 em diferentes concentrações comparando o espectro imediato com 24h após a sonicação. Além disso, em cada espectro está também representado o pico correspondente ao ácido oleico (na mesma concentração).

Considerando que, quanto maior a intensidade do pico (aumento da absorvância), maior a quantidade de partículas em suspensão <sup>[98]</sup>, pode considerar-se que a concentração  $C = 0,061\text{M}$  é a mais adequada, dentro do intervalo testado, uma vez que existe um pico mais intenso nos 222 nm. Verifica-se ainda a presença de outro pico nos 276 nm, o que poderá estar relacionado com as partículas de maior dimensão, ou seja, os agregados.

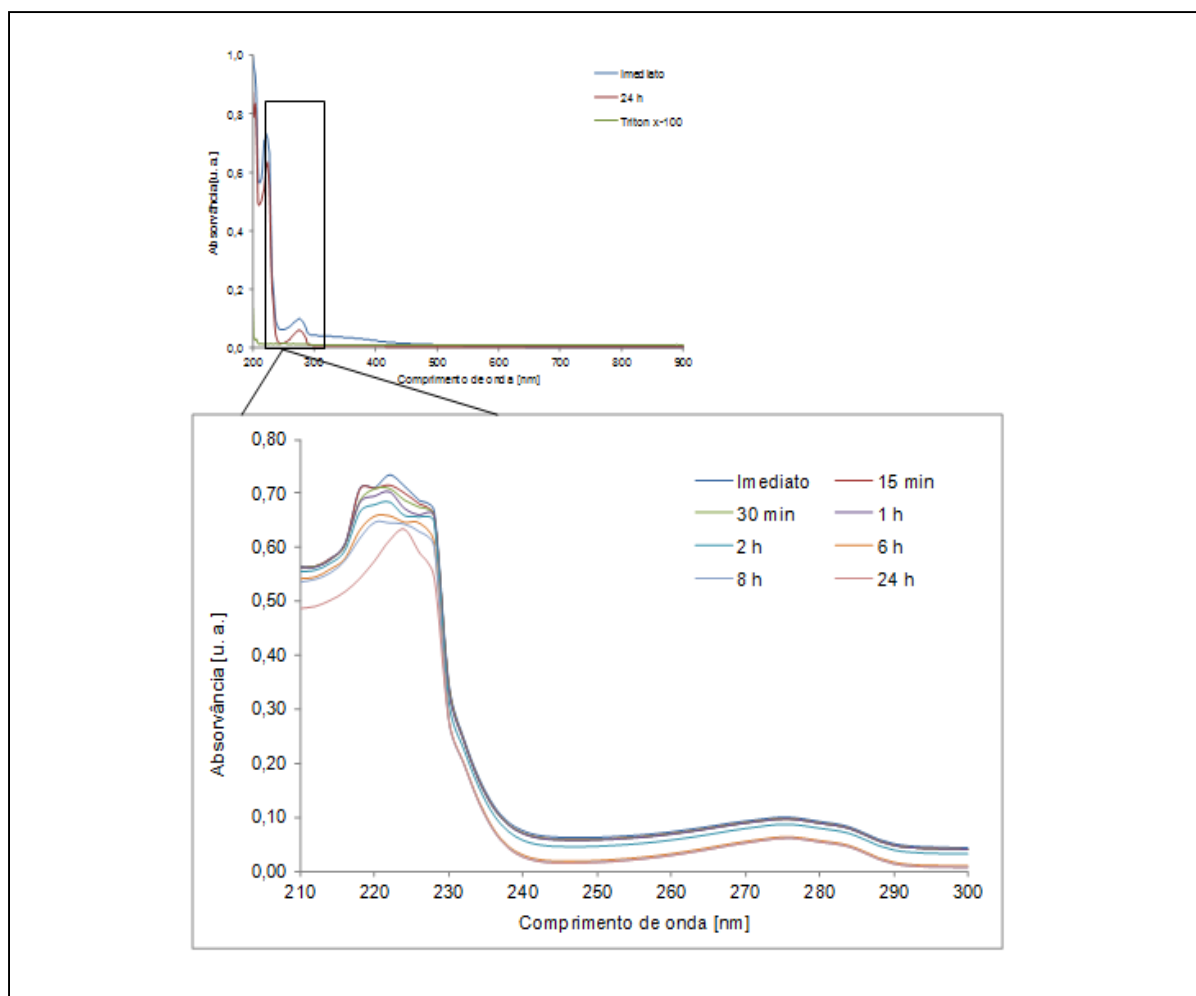
Por último, verifica-se que após as 24h ocorre sedimentação em todos os casos, pois a intensidade do pico diminui. No entanto, a posição do pico mantém-se estável, o que leva a concluir que não há formação de novas partículas <sup>[98]</sup>, apenas sedimentação das partículas já formadas.

Como já foi referido, as NPs de magnetite não apresentam um pico característico. O pico que se verifica para comprimentos de onda inferiores corresponde ao pico característico do respetivo surfactante. Existe uma diferença significativa na intensidade do espectro do surfactante e do espectro das NPs com surfactante, o que pode ser explicado pela presença de nanopartículas em suspensão, que contribuem para um aumento da intensidade do pico.

Na figura 5.18 apresenta-se a variação da intensidade dos picos em função da concentração de triton X-100. Com o aumento da concentração de triton X-100, os picos tornam-se mais intensos, sendo que, dentro do intervalo testado, a concentração  $C = 0,061\text{M}$  é a melhor. Contudo, como a intensidade dos picos ainda não diminuiu, pode concluir-se que esta não é a concentração ideal para este surfactante (deveriam ser testadas concentrações superiores).



**Figura 5.20 - Comparação do valor da absorvância nas diferentes concentrações de triton X-100, nos picos de maior intensidade (222 nm e 276 nm).**



**Figura 5.21 - Comportamento da solução de triton X-100 C=0,061M ao longo do tempo, nos picos de maior intensidade.**

Na figura anterior encontra-se representado o comportamento da solução de C=0,061M, ao longo do tempo, com evidência nos picos de maior intensidade. Como já foi referido, as suspensões de nanopartículas são estáveis por mais tempo quando existem cargas positivas na superfície das NPs que anulam as cargas negativas da superfície do surfactante, provocando estabilização da solução coloidal, uma vez que previne as partículas da agregação devido à forte repulsão colômbica <sup>[77]</sup>. Neste caso, não se obteve uma solução totalmente estável, talvez por se tratar de um surfactante não iónico.

As imagens anteriores dizem respeito a um estudo de estabilidade a curto prazo, um estudo de estabilidade para 24 horas, no máximo. A imagem seguinte representa um estudo de estabilidade a longo prazo, feito para um período máximo de 8 semanas.

Na figura 5.22 encontra-se representada a percentagem de massa de NPs com triton X-100 que se mantém em suspensão, ao longo de 8 semanas.

Como se observa na figura, passadas 6 semanas todas as soluções sedimentam completamente. Porém, a concentração de 0,061M é aquela que contém mais partículas em suspensão na primeira semana (o que confirma os resultados obtidos inicialmente).

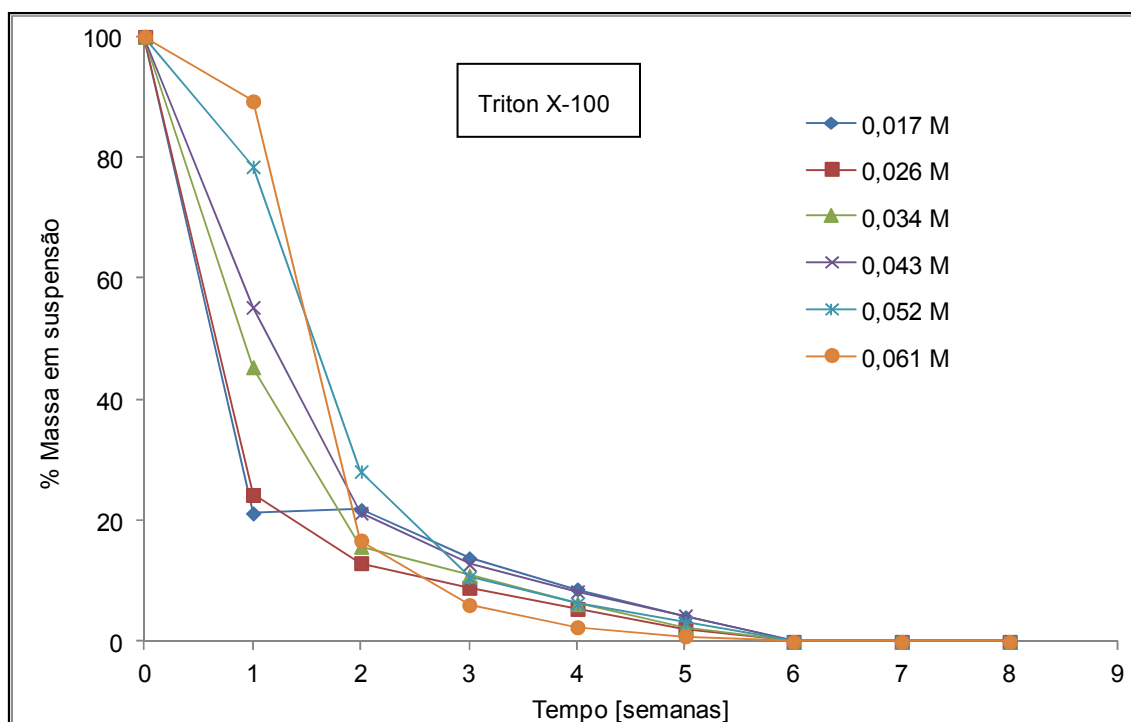


Figura 5.22 - Percentagem de massa em suspensão, ao longo do tempo, das mNPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com várias concentrações de triton X-100 (pontos correspondem a um valor médio, com n=3).

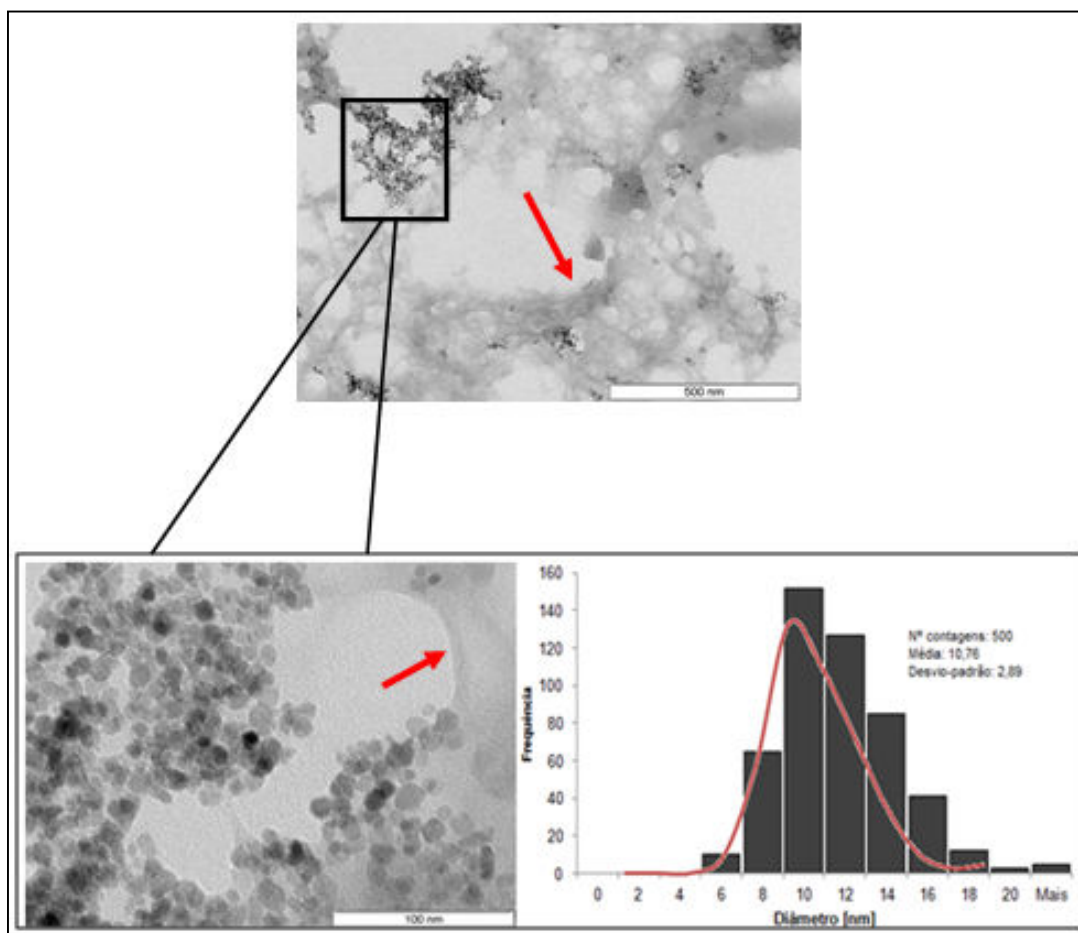
Tabela 5.3 – Valor médio de cada ponto e respetivo desvio-padrão (em %).

Concentração de triton X-100 [M]	Tempo [semanas]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,017	21,22 ± 1,98	21,79 ± 8,23	13,82 ± 5,18	8,68 ± 2,04	4,07 ± 1,25	0,00	0,00	0,00
0,026	24,27 ± 4,93	13,02 ± 1,71	8,95 ± 3,31	5,43 ± 2,64	2,11 ± 1,84	0,00	0,00	0,00
0,034	45,37 ± 20,29	15,71 ± 1,91	10,92 ± 3,70	6,25 ± 2,26	2,42 ± 0,74	0,00	0,00	0,00
0,043	55,27 ± 18,59	21,27 ± 8,37	12,77 ± 5,05	8,31 ± 3,33	4,30 ± 1,89	0,00	0,00	0,00
0,052	78,50 ± 13,29	28,14 ± 3,29	10,57 ± 0,94	6,30 ± 1,98	3,16 ± 0,28	0,00	0,00	0,00
0,061	89,33 ± 9,20	16,75 ± 4,71	6,08 ± 2,66	2,41 ± 1,64	0,90 ± 0,82	0,00	0,00	0,00

Para uma estabilização a curto prazo (máximo de 24 horas), a melhor concentração de ácido oleico é  $C=0,064$  M, de citrato de sódio é de  $C=0,005$  M e de triton X-100 é de  $C=0,061$  M.

Para uma estabilização a longo prazo (máximo de 8 semanas), a melhor concentração de ácido oleico é de  $C=0,064$  M (tal como a curto prazo), de citrato de sódio é de  $C=0,030$  M (mais elevada que a curto prazo) e de triton X-100 é de  $C=0,061$  M (tal como a curto prazo). Assim, o citrato de sódio é também o melhor surfactante a longo prazo, dentro dos três testados, uma vez que mantém uma maior quantidade de nanopartículas em suspensão durante mais tempo.

#### 5.4. Funcionalização com quitosano



**Figura 5.23** - Imagem de TEM e respetiva distribuição de tamanho das mNPs com quitosano (o quitosano está assinalado com as setas vermelhas).

Na figura 5.23 está representada uma imagem de TEM das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sintetizadas com quitosano. A imagem mostra que o quitosano, sendo um polímero de elevado peso molecular, forma uma rede na qual grupos de nanopartículas são encapsulados. Assim, em vez de existirem nanopartículas individualmente revestidas com quitosano, tem-se grupos de nanopartículas,

tornando a técnica utilizada ineficaz para o revestimento das nanopartículas individuais com quitosano. As partículas, tal com observado nas figuras de TEM anterior, apresentam forma esférica e têm tamanhos médios semelhantes com diâmetros entre 6 e 20 nm (a distribuição de tamanho é determinada medindo vários diâmetros no software *ImageJ*). Deste modo terá de ser aprofundado o estudo do revestimento das mNPs por quitosano a fim de poderem ser utilizadas no tratamento de cancro.



## **6. Conclusões e perspetivas futuras**

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo a síntese de nanopartículas de óxido de ferro, em particular de magnetite, e o estudo da estabilidade destas em soluções coloidais.

Estas nanopartículas foram produzidas pela técnica da precipitação química. Esta deve ser realizada à temperatura ambiente e em atmosfera de azoto e ter uma razão molar entre Fe<sup>2+</sup>:Fe<sup>3+</sup> de 1:2 com pH entre 9-14.

As nanopartículas produzidas têm uma tendência natural para agregarem. Assim, na ausência de qualquer surfactante, as partículas em solução tendem a sedimentar dificultando a sua funcionalização, necessária tendo em vista as aplicações pretendidas. As mNPs sintetizadas têm uma composição (determinada pela análise de DRX) típica da magnetite e, portanto, possuem potencialmente propriedades superparamagnéticas.

De modo a conseguir ter partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> individualizadas e em suspensão durante um período de tempo alargado foram utilizados três surfactantes (ácido oleico, citrato de sódio e triton X-100). Para cada um dos surfactantes foram utilizadas várias concentrações a fim de verificar qual a que tornava a solução coloidal estável por um período de tempo maior. O método utilizado para verificar a estabilidade das nanopartículas foi a medida da variação do espectro de absorvância no UV-VIS. Das concentrações estudadas de ácido oleico, citrato de sódio e triton X-100 as que estabilizavam as mNPs, a curto prazo (24 horas), foram as C=0,064M, C=0,005M e C=0,061M, respetivamente. No caso do triton X-100, uma vez que a intensidade dos picos de absorvância, em função da concentração deste surfactante, esteve sempre a aumentar, pode concluir-se que ainda não se atingiu a concentração ideal para o triton X-100. Desta forma, é necessário testar concentrações superiores a C=0,061M, a fim de encontrar a concentração mais adequada para este surfactante. Num estudo a longo prazo (2 meses), a melhor concentração de ácido oleico, citrato de sódio e triton X-100 é de C=0,064M, C=0,030M e C=0,061M, respetivamente.

Dentro do grupo de surfactantes testados, o citrato de sódio aparenta ser o melhor surfactante, uma vez que mantém as nanopartículas mais tempo em suspensão. O citrato de sódio torna a solução de nanopartículas estável tanto a curto como a longo prazo. Uma semana após a síntese das mNPs revestidas por citrato de sódio, todas as soluções apresentam grande parte das partículas em suspensão e, oito semanas mais tarde, algumas dessas soluções ainda se mantêm em suspensão. O citrato de sódio é uma molécula iónica pequena, carregada negativamente pelo que a carga negativa do citrato de sódio neutraliza a carga das partículas, diminuindo a atração eletrostática entre elas. Esta circunstância pode justificar o facto de o citrato de sódio ser o melhor surfactante, dentro do grupo testado.

Em relação à funcionalização com quitosano, concluiu-se que o método utilizado (método da gelificação ionotrópica) não é um método viável, uma vez que as partículas não ficaram



corretamente revestidas com este polímero. Neste caso, o quitosano formou uma rede na qual incorporou as partículas, não as revestindo uniformemente. Deste modo, será necessária mais investigação e deverá ser aprofundado o estudo do revestimento das mNPs com quitosano, a fim de poderem ser utilizadas no tratamento de cancro.

Este trabalho mostrou ser inovador quanto ao estudo da estabilidade das mNPs em solução. Embora se trate de um estudo inicial, este trabalho sugere utilizar outros métodos de síntese (como síntese hidrotermal, decomposição térmica) para a produção de NPs monodispersas, bem como o estudo de outros surfactantes que permitam um controlo ainda melhor das partículas em suspensão.

## 7. Bibliografia

- [1] - Lodhia, J.; Mandarano, G.; Ferris, N. J.; Eu, P.; Cowell, S. F.; **Development and use of iron oxide nanoparticles (part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI.** *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, 6(2): 1-11, 2010.
- [2] - Gupta, A. K.; Gupta, M.; **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.** *Biomaterials*, 26, 3995-4021, 2005.
- [3] - Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T.; **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy.** *Advances Drug Delivery Reviews*, 63, 24-46, 2011.
- [4] - Gubin, S. P.; **Introduction – Magnetic Oxides**, in: Gubin, S. P., eds, *Magnetic Nanoparticles*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Federal Republic of Germany, 2009.
- [5] - Sun, C.; Lee, J. H.; Zhang, M.; **Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1252-1265, 2008.
- [6] - Dias, A. M. G. C.; Hussain, A.; Marcos, A. S.; Roque, A. C. a.; **A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides.** *Biotechnology Advances*, 29: 142-145, 2011.
- [7] - Tarjat, P.; Morales, M. P.; Verdaguer, S. V.; Carreño, T. G.; Serna, C. J.; **The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.** *Journal of physics D: Applied physics*, 36, 182-197, 2003.
- [8] - Lin, M. M.; Kim, D. K.; Haj, A. J. E.; Dobson, J.; **Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation clinical applications.** *IEEE Transactions on nanobioscience*, 7, 298-305, Dezembro 2008.
- [9] – [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [10] – [www.micromod.de](http://www.micromod.de) (último acesso em 15-09-2012).
- [11] – [www.chemicell.com](http://www.chemicell.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [12] – [www.magnisense.com](http://www.magnisense.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [13] – [www.diagnosticbiosensors.com](http://www.diagnosticbiosensors.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [14] – [www.dextermag.com](http://www.dextermag.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [15] – [www.oceannanotech.com](http://www.oceannanotech.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [16] – [www.imego.com](http://www.imego.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [17] – [www.integratedsoft.com](http://www.integratedsoft.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [18] – [eshop.emdchemicals.com](http://eshop.emdchemicals.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [19] - [www.magsenselifesci.com](http://www.magsenselifesci.com) (último acesso em 15-09-2012).

- [20] – [www.turbobeads.com](http://www.turbobeads.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [21] – [www.biotechniques.com](http://www.biotechniques.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [22] – [www.magnabeat.com](http://www.magnabeat.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [23] – [www.nanotherics.com](http://www.nanotherics.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [24] – [www.sepmag.eu](http://www.sepmag.eu) (último acesso em 15-09-2012).
- [25] – [www.magforce.de](http://www.magforce.de) (último acesso em 15-09-2012).
- [26] – [www.amagpharma.com](http://www.amagpharma.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [27] – [www.estapor.com](http://www.estapor.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [28] – [www.miltenylbiotec.com](http://www.miltenylbiotec.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [29] – [www.imvitrogen.com](http://www.imvitrogen.com) (último acesso em 15-09-2012).
- [30] - Soares, P.; Ferreira, I.; Igreja, R.; Novo, C.; Borges, J.; **Application of Hyperthermia for Cancer Treatment: recent patents review**. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 7, 64-73, 2012.
- [31] – Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T.; **Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (1): 1-11, 2005.
- [32] - Laurent, S.; Dutz, S.; Häfali, U. O.; Mahmoudi, M.; **Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles**. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166, 8-23, 2011.
- [33] - <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.17215625.html> (último acesso em 13-09-2012).
- [34] – Lübke, A.; Alexiou, C.; Bergemann, C.; **Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting**. *Journal of Surgical Research*, 95, 200-206, 2001.
- [35] - Willard, M. A., Kurihara, L. K.; Carpenter, E. E.; Calvin, S.; Harris, V. G.; **Chemically prepared magnetic nanoparticles**. *International Materials Reviews*, 49, 125-170, 2004.
- [36] - Souza, K.C.; Mohallem, N.D.S.; Sousa, E.; **Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em biomedicina**. *Quim. Nova*, 34 (10): 1692-1703, 2011.
- [37] – Dobson, J.; **Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery**. *Drug Development Research*, 67:55-60, 2006.
- [38] – Kita, E.; Oda, T.; Sato, S.; Minagawa, M.; Yanagihara, H., *et al.*, **Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy**. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 43: 474011, 2010.
- [39] – [www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov) (último acesso em 17-07-2012).
- [40] - Massart, R.; **Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media**. *IEEE Transactions on Magnetics*, 17, 1981.

- [41] - Tao, K.; Dou, H.; Sun, K.; **Interfacial coprecipitation to prepare magnetite nanoparticles: concentration and temperature dependence.** *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 320, 115-122, 2008.
- [42] - Jolivet, J. P.; Belleville, P.; Tronc, E.; **Influence of Fe(II) on the formation of the spinel iron oxide in alkaline medium.** *Clays and Clay Minerals*, 40(5): 531-539, 1992.
- [43] - Wei, X.; Viadero, R. C.; **Synthesis of magnetic nanoparticles with ferric iron recovered from acid mine drainage: implications for environmental engineering.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294, 280-286, 2007.
- [44] - Babes, L.; Denizot, B.; Tanguy, G.; **Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study.** *J Colloid Interface Sci*, 212: 474-482, 1999.
- [45] - Kim, D. K.; Mikhaylova, M.; Zhang, Y.; Muhammed, M.; **Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles.** *Chem. Mater.*, 15, 1617-1627, 2003.
- [46] - Sun, J.; Zhou, S.; Hou, P.; Yang, Y.; Weng, J.; Li, X.; Li, M.; **Synthesis and characterization of biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles.** *Journal of biomedical materials research part A*, pp. 333-341, 2006.
- [47] - Kim, K. C.; Kim, E. K.; Lee, J. W.; Maeng, S. L.; Kim, Y. S.; **Synthesis and characterization of magnetite nanopowders.** *Current Applied Physics*, 8, 758-760, 2008.
- [48] - Maity, D. A.; Agrawal, D. C.; **Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308, 46-55, 2007.
- [49] - Damasceno, B. P. G. L.; Silva, J. A.; Oliveira, E. E.; silveira, W. L. L.; Araújo, I. B.; Oliveira, A. G.; Egito, E. S. T.; **Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis.** *Rev. Ciênc. Farm. Apl.*, 32(1): 9-18, 2011.
- [50] - Najjar, R.; **Microemulsions\_An introduction to properties and applications.** *InTech*, 2012.
- [51] - Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.M Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E.; **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.** *Journal of Controlled Released*, 70 (1-2): 1-20, Janeiro 2010.
- [52] - Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J; Veiga, F.; **Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2, 8-21, 2006.
- [53] - Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C.; **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18, Janeiro 2010.
- [54] - Lawrance, M. J.; Rees, G. D.; **Microemulsion-based media as novel drug delivery systems.** *Adv Drug Deliv Rev*, 45 (1): 89-121.
- [55] - Pérez, J. A. L.; Quintela, M. A. L.; Mira, J.; Rivas, J.; **Preparation of magnetic fluids with particles obtained in microemulsion.** *IEEE Transactions on Magnetics*, 33 (5): 4359-4362, Setembro 1997.
- [56] - Gupta, A. K.; Wells, S.; **Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization and cytotoxicity studies.** *IEEE Transactions on nanobioscience*, 3 (1): 66-73, Março 2004.

- [57] - Pileni, M. P.; Duxin, N.; **Micelle technology for magnetic nanosized alloys and composites**. *Chem. Innov.*, 30 (2), 2000.
- [58] - Lee, H. S.; Lee, W. C.; Furubayashi, T.; **A comparison of coprecipitation with microemulsion methods in the preparation of magnetite**. *Journal of Applied Physics*, 85 (8): 5231-5233, Abril 1999.
- [59] - Mathew, D.; Juang, R.; **An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions**. *Chemical Engineering Journal*. 129 (1-3): 51-65, 2007.
- [60] - Liang, X.; Jia, X.; Cao, L.; Sun, J.; Yang, Y.; **Microemulsion synthesis and characterization of nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystalline**. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31, 1043-1049, 2010.
- [61] - Lee, Y.; Lee, J.; Bae, C. J.; Park, J. G.; **Large-Scale Synthesis of Uniform and Crystalline Magnetite Nanoparticles Using Reverse Micelles as Nanoreactors under Reflux Conditions**. *Adv. Functional Mat.*, 15 (3): 503-509, Março 2005.
- [62] - Mori, Y.; Okatsu, Y.; Tsujimoto, Y.; **Titanium dioxide nanoparticles produced in water-in-oil emulsion**. *J. Nanopart. Res.*, 3, 219-225, 2001.
- [63] - Tang, J.; Myers, M.; Bosnick, K. A.; Brus, L. E.; **Magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals: spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics**. *J. Phys. Chem. B.*, 107, 7501-7506, 2003.
- [64] - Mizutani, N.; Iwasaki, T.; Watano, S.; Yanagida, T.; Tanaka, H.; Kawai, T.; **Effect of ferrous/ferric ions molar ratio on reaction mechanism for hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles**. *Bull. Mater. Sci.*, 31 (5): 713-717, Outubro 2008.
- [65] - Natarajan, S.; Mandal, S.; Mahata, P.; Rao, V. V.; Ramaswamy, P.; Banerjee, A.; Paul, A. K.; Ramya, K. V.; **The use of hydrothermal methods in the synthesis of novel open-framework materials**. *J. Chem. Sci.*, 118 (6): 525-536, Novembro 2006.
- [66] - Somiya, S.; Roy, R.; **Hydrothermal synthesis of fine oxide powders**. *Bull. Mater. Sci.* 23 (6): 453-460, Dezembro 2000.
- [67] - Haw, C. Y.; Mohamed, F.; Chia, C. H.; Radiman, S.; Zakaria, S.; Huang, N. M.; Lim, H. N.; **Hydrothermal synthesis of magnetic nanoparticles as MRI contrast agents**. *Ceramics International*, 36, 1417-1422, 2010.
- [68] - Mao, B.; Kang, Z.; Wang, E.; Lian, S.; Gao, L.; Tian, C.; Wang, C.; **Synthesis of magnetite octahedrons from iron powders through a mild hydrothermal method**. *Materials Research Bulletin*, 41, 2226-2231, 2006.
- [69] - Maity, D.; Kale, S. N.; Ghanekar, R. K.; Xue, J. M.; Ding, J.; **Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in tri(ethylene glycol)**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 3093-3098, 2009.
- [70] - Chin, S. F.; Pang, S. C.; Tan, C. H.; **Green synthesis of magnetite nanoparticles (via thermal decomposition method) with controllable size and shape**. *J. Mater. Environ. Sci.*, 2 (3): 299-302, 2011.
- [71] - Yuan, Q.; Venkatasabramanian, R.; Hein, S.; Misra, R. D. K.; **A stimulus-responsive magnetic nanoparticle drug carrier: magnetite encapsulated by chitosan-grafted-copolymer**. *Acta Biomaterialia*, 4, 1024-1037, 2008.

- [72] - Lee, C. M.; Jeong, H. J.; Kim, E. M.; Kim, D. W.; Lim, S. T.; Jang, K. Y.; Jeong, Y. Y.; Nah, J. W.; Sohn, M. H.; **SPION-loaded chitosan-linoleic acid nanoparticles to target hepatocytes**. *International Journal of Pharmaceutics*, 371, 163-169, 2009.
- [73] - Zhen, L.; Wei, L.; Gao, M.; Lei, H.; **One-pot reaction to synthesize biocompatible magnetic nanoparticles**. *Adv. Mater.*, 17, 1001-1005, 2005.
- [74] - Woo, K.; Hang, J. W.; **Surface modification of hydrophobic iron oxide nanoparticles for clinical applications**. *IEEE Trans. Magn.*, 41 (10): 4137-4139, Outubro 2005.
- [75] - Khosroshahi, M.E.; Ghazanfari, L.; **Preparation and characterization of silica-coated iron oxide bionanoparticles under N<sub>2</sub> gas**. *Physica E*, 42, 1824-1829, 2010.
- [76] - Bhui, D. K.; Bar, H.; Sarkar, P.; Sahoo, G.; De, S. P.; Misra, A.; **Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution**. *Journal of Molecular Liquids*, 145, 33-37, 2009.
- [77] - Desai, R.; Mankad, V.; Gupta, S.; Jha, P.; **Size distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment**. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4: 30-34, 2012.
- [78] - Qu, J.; Liu, G.; Wang, Y.; Hong, R.; **Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles used for hyperthermia**. *Advanced Powder Technology*, 21, 461-467, 2010.
- [79] - Yang, K.; Peng, H.; Wen, Y.; Li, N.; **Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles**. *Applied Surface Science*, 256, 3093-3097, 2010.
- [80] - <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---O/Oleic-Acid.htm> (último acesso em 10-09-2012).
- [81] - Tejamaya, M.; Römer, I.; Marrifield, R. C.; Lead, J. L.; **Stability of Citrate, PVP, PEG Coated Nanoparticles in Ecotoxicology Media**. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 7011-7017, 2012.
- [82] - Brewer, S.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M.M Frazen, S.; **Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces**. *Langmuir*, 21, 9303-9307, 2005.
- [83] - <http://www.chemblink.com/products/68-04-2.htm> (último acesso em 10-09-2012).
- [84] - [http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/detergent\\_removal.htm](http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/detergent_removal.htm) (último acesso em 10-09-2012).
- [85] - Saien, J.; Ojaghloo, Z.; Rasoulifard, M. H.; **Homogeneous and heterogeneous AOPs for rapid degradation of Triton X-100 in aqueous media via UV light, nano titania hydrogen peroxide and potassium persulfate**. *Chemical Engineering Journal*, 167, 172-182, 2011.
- [86] - Tsai, Z. T.; Wang, J. F.; Kuo, H.; Shen, C.; Wang, J.; Yen, T.; **In situ preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potencial MRI contrast agent useful for cell tracking**. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 322, 208-213, 2010.
- [87] - Chenguang, L.; Yulong, T.; Chengsheng, L.; Xiguang, C.; Lejun, Y.; **Preparations, Characterizations and Applications of Chitosan-based Nanoparticles**. *Journal of Ocean University of China*, 6(3): 237-243, 2007.
- [88] - Zhang, W.; Jia, S.; Wu, Q.; Ran, J.; Liu, Y.; Hou, J.; **Studies of the magnetic field intensity on the synthesis of chitosan-coated magnetite nanocomposites by co-precipitation method**. *Materials Science and Engineering C*, 32, 381-384, 2012.

- [89] – Shi, C.; Zhu, Y.; Ran, X.; Wang, M.; Su, Y.; Cheng, T.; **Therapeutic Potencial of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine**. *Journal of Surgical Research*, 133, 185-192, 2006.
- [90] - [http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic41-03-003\\_2.html](http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic41-03-003_2.html) (último acesso em 10-10-2012).
- [91] - Gnanaprakash, G.; Philip, J.; Jayakumar, T.; Raj, B.; **Effect of Digestion Time and Alkali Addition Rate on Physical Properties of Magnetite Nanoparticles**. *J. Phys. Chem. B*, 111, 7978-7986, 2007.
- [92] - Calvo, P.; López, C.R.; Jato, J. L. V.; Alonso, M. J.; **Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers**. *Journal of Applied Polymer Science*, 63: 125-132, 1997.
- [93] – Sailaja, A. K.; Amareshwar, P.; Chakravarty, P.; **Chitosan nanoparticles as a drug delivery system**. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(3): 474-484, 2010.
- [94] – Baptista, A. C.; **Produção de biobaterias a partir de membranas obtidas pela técnica de electrofiação**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, FCT-UNL, 2009.
- [95] – Wu, S.; Sun, A.; Zhai, F.; Wang, J.; Xu, W.; Zhang, Q.; Volinsky, A.; **Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticlessynthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation**. *Materials Letters*, 65, 1882-1884, 2011.
- [96] - Klokkenburg, M.; Hilhorst, J.; Ern , B. H.; **Surface analysis of magnetite nanoparticles in cyclohexane solutions of oleic acid and oleylamine**. *Vibrational Spectroscopy*, 43, 243-248, 2007.
- [97] - Sileikaite, A.; Puiso, J.; Prosycevas, I.; Tamulevicius, S.; **Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate**; *Materials Science*, 15 (1): 21-27, 2009.
- [98] – Sileikaite, A.; Prosycevas, I.; Puiso, J.; Juraitis, A.; Guobiene, A.; **Analysis of Silver Nanoparticles produced by chemical redution of silver salt solution**. *Materials Science*, 7(4): 287-291, 2006.